

Nuno Miguel Lourenço Alexandre

APLICAÇÃO DE ENXERTOS VASCULARES ARTIFICIAIS DE POLIMEROS BIODEGRADÁVEIS NUM MODELO ANIMAL

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Veterinárias submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Ana Lúcia Luís

Categoria – Professora Auxiliar

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Co-orientador – Ana Colette Maurício

Categoria – Professora Associada com agregação

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Co-orientador – José Domingos Santos

Categoria – Professor Associado com agregação

Afiliação – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Declaração:

As conclusões apresentadas nesta dissertação são baseadas nos artigos científicos:

ARTIGOS PUBLICADOS OU EM PUBLICAÇÃO, NO ÂMBITO DESTA DISSERTAÇÃO, EM REVISTAS NACIONAIS OU INTERNACIONAIS COM ARBITRAGEM CIENTIFICA:

Andrade, F.K., Alexandre, N., Amorim, I., Gärtner, F., Mauricio, A.C., Luis, A.L., Gama, F.M. **(2013)**. Studies on the biocompatibility of bacterial cellulose. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 28(1), 97-112.

Alexandre, N., Ribeiro, J., Gärtner, A., Pereira, T., Amorim, I., Fragoso, J., Lopes, A., Fernandes J., Costa E., Santos-Silva A., Santos J.D., Maurício A.C., Luís A.L. **(2014)**. Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting—*In vitro* and *in vivo* studies. Journall of Biomedical Materials Research Part A, (*in press*).

COMUNICAÇÕES E PAINÉS EM REUNIÕES NACIONAIS E INTERNACIONAIS:

Alexandre, N., Gärtner, A., Amorim, I., Santos, J.D., Lopes, A., Maurício, A.C., Luís, A.L. **(2010)**. Application of artificial vascular polyvinyl alcohol hydrogel grafts in sheep - our experience to date. II Jornadas Científicas do CECA – ICETA, Vairão, Portugal. **(Comunicação oral)**.

Alexandre, N., Lopes, A., Nunes, N., Amorim, I., Maurício, A.C., Santos, J.D., Luís A.L. **(2013)**. Application of Vascular grafts of polyvinyl alcohol hydrogel associated to mesenchymal stem cells from Whartons jelly in an animal model. MATERIAIS 2013, International Conference, Sociedade Portuguesa de Materiais, Coimbra, Portugal **(Comunicação oral)**.

Alexandre, N., Nunes, N., Lopes, A., Rodrigues, M., Maurício, A.C., Santos, J.D., Luís, A.L. **(2013)**. The *in vitro* mechanical properties of small diameter poly(vinyl) alcohol hydrogel (PVA) plus dextran (Dx) based vascular grafts. 5th International conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues, Stiges, Spain **(Painel)**.

Alexandre, N., Lopes, A., Rodrigues, M., Amorim, I., Pereira, T., Gärtner, A., Maurício, A.C., Santos, J.D., Luís, A.L. **(2013)**. *In vivo* evaluation of the potencial of mesenchymal stem cells (MSCs) from whartons jelly (WJ) to improve the biocompatibility of poly(vinyl) alcohol hydrogel (PVA) membranes in animal model (sheep). 8th International Meeting of the Portuguese Society for Stem Cells and Cell Therapies, Faro, Portugal. **(Painel)**.

No cumprimento do disposto no n.º 2 do artigo 8º do Decreto-lei n.º 388/70, como autora desta dissertação, declaro que participei na concepção, execução e interpretação dos resultados que estiveram na base destes artigos. Retenho todos os direitos de autor relativos a esta dissertação e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos e livros).

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho permitiu-me descobrir que em investigação o trabalho resulta de um esforço conjunto e o resultado final só é possível com a colaboração de uma equipa alargada.

Em primeiro lugar um especial agradecimento á minha orientadora Professora Doutora Ana Lúcia Luís que desde o primeiro momento se mostrou disponível para ajudar no que fosse necessário, por toda a amizade, empenho demonstrado para que este trabalho chegasse á sua conclusão e por me fazer sentir em casa.

O agradecimento especial á minha co-orientadora Professora Doutora Ana Colette Maurício por me ter aberto a porta do ICBAS, por ter colocado à disposição todos os recursos necessários para que este trabalho chegasse a bom porto, por acreditar em mim e neste trabalho e pelo rigor imposto na revisão dos artigos.

Um agradecimento também ao meu co-orientador Professor Doutor José Domingos Santos pela sua sabedoria na área dos biomateriais, pelo entusiasmo que coloca nos projectos onde participa e por colocar à disposição todos os recursos necessários da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Á Dra. Irina Amorim pela preciosa ajuda e colaboração na realização e análise das amostras histopatológicas.

Á Professora Doutora Ascensão Lopes e Dr. Miguel Rodrigues por todo o auxílio no fabrico dos biomateriais e por estarem sempre disponíveis para fazerem mais.

Ao Dr. Guilherme Valadares por toda a colaboração na parte das ecografias, por partilhar a sua imensa sabedoria na área da imagiologia, pela amizade de mais de 20 anos o meu agradecimento.

Aos Professores Elísio Costa e Alice Santos-Silva por me terem aberto a porta da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela excelente colaboração dos testes *in vitro*, por todo o esforço e empenho demonstrados sem os quais não seria possível concluir este trabalho.

Ao Professor Doutor Afonso de Almeida pela sua ajuda e empenho sem o qual não se teria iniciado este trabalho, pela amizade e por estar sempre disponível para resolver qualquer problema.

Aos Professores Ofélia Bento, Luís Fernandes e Carlos Roquete directores do Departamento de Zootecnia o meu agradecimento por estarem sempre disponíveis para facilitar a minha vida profissional.

Os meus agradecimentos às instituições que me apoiaram e acolheram: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto, Faculdade de Engenharia - Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia-Universidade do Porto, Departamento de Zootecnia – Universidade de Évora, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas - Universidade de Évora e Hospital Veterinário da Universidade de Évora

À ZEA-Sociedade Unipessoal Lda por todo o apoio com o manejo e alimentação dos animais utilizados na experimentação.

Um agradecimento à Fundação para a Ciência e Tecnologia – Ministério da Educação e Ciência pela Bolsa de Doutoramento SFRH/BD/64838/2009.

Aos Doutores João Fragoso e Ricardo Alves por toda a colaboração na realização das anestésias e intervenções cirúrgicas em ovinos.

À Dra. Leonor Pinho pelo auxílio na alimentação dos animais nos momentos em que estive ausente.

Às técnicas de laboratório Dra. Alexandra Rêma, Dra. Soraia Gonçalves e Eng^a. Luisa Fialho por toda a ajuda na realização dos procedimentos de laboratório, por toda a boa disposição e paciência.

Agradeço por fim a todos os meus amigos e colegas de trabalho, Sandra Branco, Elisa Bettencourt e Ricardo Romão pela preocupação e interesse no meu trabalho.

Por fim agradeço à minha família pelo apoio incondicional e compreensão ao longo deste projecto em especial aos meus pais, avó, tios e primos constituindo uma importante motivação para a conclusão deste projecto.

E por fim uma palavra muito especial para a minha namorada, por todo o amor e carinho, por todo o apoio fundamentais para a conclusão deste projecto. Amo-te muito.

Ao meu cãozito, Zico (Zé Pitucho) por seres uma fonte de boa disposição e seres o melhor amigo do homem.

A todos o meu sincero Obrigado.

Índice Geral

RESUMO	17
ABSTRACT	20
RÉSUMÉ	23
CAPITULO I.....	27
INTRODUÇÃO – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
1. Histologia e anatomia vascular.	28
1.2 Sistema arterial.	28
1.2.1 Arteríolas.....	31
1.3. Sistema venoso.	32
1.3.1. Vénulas.	35
1.4. Capilares.....	35
1.5. Anastomoses.	35
1.5.1. Anastomoses arterio-venosas.	35
1.5.2. Anastomoses inter-arteriais.	36
2. Fisiologia dos vasos sanguíneos.	37
2.1. Controlo humoral da circulação.....	38
2.1.1. Vasodilatadores.	38
2.1.2. Vasoconstrictores.....	43
2.1.3. Regulação sistémica do fluxo sanguíneo pelo sistema nervoso.	47
3. Biomecânica dos vasos e fluxo sanguíneo.	54
3.1. Biomecânica vascular.	54
3.2. Fluxo laminar e turbulento.....	55
3.3. Dinâmica do fluxo e sua influência na hemocompatibilidade.....	56
3.4. Relação fluxo e hiperplasia da íntima.....	57
4. Angiogénese e vasculogénese	64
5. Interação dos mecanismos de coagulação com biomateriais e dispositivos cardiovasculares.....	65
5.1. Interações sangue-biomaterial.	66
5.2. Estratégias de melhoria da biocompatibilidade dos biomateriais.....	69

	14
5.3.Modificação físico-química.	70
5.4.Biofuncionalização de superfícies.	71
6.Principais afecções do sistema vascular.	77
6.1. Doença arterial coronária.	77
6.2. Doença arterial carotídea.	79
6.3. Doença arterial periférica.	79
6.4. Aneurisma da aorta abdominal.....	81
7.Enxertos vasculares.....	82
7.1. Enxertos vasculares autólogos.....	83
7.2. Enxertos vasculares homólogos (alloenxertos) e heterólogos (xenoenxertos).	85
7.3. Próteses vasculares sintéticas.	88
7.3.1. Politetrafluoroetileno expandido (ePTFE).	89
7.3.2 Dacron.	91
7.3.3. Poliuretano (PU).....	92
8.Técnicas de anastomose vascular.	94
8.1. Tipos de anastomose.....	94
8.2. Métodos de fixação ou coaptação.....	97
9. Engenharia de tecidos em investigação de cirurgia vascular.	101
9.1.Tecidos descelularizados.	104
9.2. Formação de vasos sanguíneos por organização de camadas de células ou de tecidos através de do método de <i>self assembly</i>	106
9.3. Origem das células para ET.	107
9.4. Matrizes de polímeros biodegradáveis, hidrogéis ou biopolímeros.....	110
9.4.1.Matrizes de polímeros biodegradáveis.	110
9.4.2.Matrizes de biopolímeros e hidrogéis.	112
10. Modelos experimentais e métodos de pesquisa em cirurgia vascular.	113
11. Polivinil álcool hidrogel.....	119
10.1. Aplicações biomédicas do PVA.....	120
11. Dextrano.	121

11.1 Aplicações biomédicas do dextrano	121
CAPITULO II.....	123
ESTADO DA ARTE E OBJECTIVOS DO ESTUDO	123
CAPITULO III.....	134
RESULTADOS	134
1. Avaliação da biocompatibilidade, hemocompatibilidade e trombogenicidade	135
1.1. Introdução	136
1.2. Artigo 1	138
1.3. Artigo 2	155
1.4. Artigo 3	170
1.4. Conclusões.....	215
2. Avaliação funcional e estrutural das próteses vasculares de PVA/Dx num modelo animal.....	216
2.1. Introdução	217
2.2. Artigo 4	219
2.3. Conclusões.....	270
CAPITULO IV	271
DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	271
CAPITULO V	286
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	286

RESUMO

Com este trabalho pretendeu-se estudar pré-clinicamente a utilização de uma prótese vascular do polímero hidrófilico polivinil álcool hidrogel (PVA) e do polissacárido dextrano num modelo animal anatomicamente e fisiologicamente próximo do homem. A prótese vascular foi produzida com um baixo diâmetro (diâmetro interno igual a 5 mm) com o objectivo de se anastomosar com uma artéria de diâmetro equivalente para simular os procedimentos de revascularização que se encontram na prática clínica. Historicamente, as próteses sintéticas de baixo diâmetro sempre apresentaram piores resultados funcionais do que os enxertos autólogos de diâmetro equivalente por diversas razões de ordem biológica, mecânica e estrutural. Pretendeu-se caracterizar a biocompatibilidade e as interacções sangue-material *in vitro* e *in vivo* da prótese de PVA/Dx antes de proceder à sua testagem funcional e estrutural no modelo animal. Paralelamente investigou-se a influência da associação de um sistema celular, as células estaminais mesenquimatosas (MSCs) obtidas a partir da geleia de Warton do cordão umbilical no desempenho funcional, estrutural e na sua biocompatibilidade em relação aos tecidos envolventes.

O co-polímero polivinil álcool hidrogel e dextrano nunca antes testado nesta aplicação e foi produzido na relação de 90:10 através de um processo de reticulações física pelo método de congelação/descongelação. Com o objectivo de reforçar a reticulação as próteses foram sujeitas a um processo de *annealing* para melhorar as características mecânicas com o objectivo de resistir ao ambiente físico adverso colocado pela pressão arterial pulsátil.

O modelo animal escolhido para a experimentação *in vivo* foi a ovelha (*Ovis aries*). Foi realizado um estudo de biocompatibilidade na ovelha com uma duração máxima de 32 semanas. Um grupo de animais (grupo 1) foi implantado por via subcutânea, com os discos de PVA com 15,5 mm de diâmetro e um segundo grupo (grupo 2) foi implantado por via subcutânea, com os discos de PVA cobertos com uma monocultura confluyente de MSCs humanas derivadas de geleia de Wharton. O terceiro grupo foi implantado com membranas PVA/Dx com o mesmo diâmetro. Foi também incluído um grupo de controlo negativo de 6 animais, conforme exigido pela norma ISO 10993-6. O grupo controlo positivo (Grupo 5) foi implantado por via subcutânea, com amostras de discos de politetrafluoretileno expandido (MAXIFLO™, ePTFE Vascular Prótese, Vascutek Ltda, Escócia), com uma área equivalente ao das membranas implantadas de PVA. As membranas foram recolhidas com os tecidos envolventes em diversos pontos temporais até ao período máximo de 32 semanas. As amostras foram posteriormente estudadas para a reacção inflamatória seguindo as linhas orientadoras da norma ISO 10993-6 (anexo E). Após análise de resultados o PVA/Dx demonstrou

ser um biomaterial com potencial para ser utilizado na reconstrução vascular. Em relação á biocompatibilidade, os resultados demonstraram que o PVA, o PVA com dextrano e o PVA coberto por MSCs humanas isoladas da geleia de *Wharton* do cordão umbilical são apenas ligeiramente irritantes para os tecidos circundantes de acordo com a norma ISO 10993-6 (Anexo E).

Em relação ao estudo da interacção sangue-biomaterial foram utilizadas membranas de PVA/Dx nas dimensões referidas anteriormente, como controlo positivo foram utilizadas esferas ou lâminas de vidro e como controlo negativo membranas de polipropileno. Estas amostras foram testadas *in vitro* com sangue total, plasma rico em plaquetas e com plasma pobre em plaquetas obtidos de ovelha e humanos. A determinação do índice de hemólise evidenciou o PVA/Dx como um biomaterial não hemolítico (0,014%) sendo seguro para aplicações que contactem com o sangue. A trombogenicidade de PVA/Dx foi avaliada pela quantificação de adesão/activação através dos ensaios de: medição da actividade de lactato de desidrogenase; citometria de fluxo e da quantificação do tempo de coagulação do sangue total. Adicionalmente, a morfologia das plaquetas foi observada por microscopia electrónica de varrimento (MEV) após contacto com as diferentes superfícies utilizadas no estudo. Os resultados destes ensaios permitiram concluir que activação e adesão plaquetária foram muito satisfatórios sendo até inferiores aos resultados do controlo positivo. Os resultados destes parâmetros foram depois confirmados pela análise de imagens de SEM, onde morfologicamente as plaquetas adsorvidas nas membranas de PVA/Dx apresentavam um fenótipo de fraca activação. A activação da cascata de coagulação foi igualmente avaliada no âmbito das interacções sangue-material, tendo-se recorrido á medição dos perfis de recalcificação do plasma e dos níveis de formação do complexo trombina-antitrombina confirmando-se o PVA/Dx como um biomaterial que induz uma fraca activação da cascata de coagulação. Posteriormente avaliou-se a hemocompatibilidade do biomaterial PVA/Dx *in vivo* em dois grupos de ovelhas implantados respectivamente com próteses vasculares de PVA/Dx de 5 e 7 cm com seis animais cada. O sangue foi recolhido em diversos pontos temporais até a um máximo de 16 semanas, tendo-se avaliado diversos parâmetros hematológicos e da coagulação, confirmando os resultados obtidos *in vitro* e reforçando à aptidão do PVA/Dx enquanto material para aplicações biomédicas que contactam com o sangue. Na fase final da caracterização funcional do PVA/Dx procedeu-se à sua implantação na artéria carótida comum esquerda através de uma anastomose topo a topo. Vinte e quatro ovelhas adultas foram utilizadas neste ensaio funcional. Dezoito animais foram alocados aos grupos que utilizaram próteses de PVA/Dx. Um grupo de seis animais para além da prótese vascular recebeu também uma injeção perivascular MSCs no

local das anastomoses. Um outro grupo de seis animais foi medicado com um protocolo de anticoagulação. Adicionalmente, um grupo de ovelhas foi implantado com enxertos de PVA/Dx sem administração de anticoagulantes e MSCs. Finalmente, no grupo de controlo utilizaram-se próteses de ePTFE. A avaliação funcional foi realizada utilizando ecografia em modo B e *Doppler* em diversos pontos temporais, começando às 24 horas pós-cirurgia até as 24 semanas. Os resultados da taxa de permeabilidade evidenciaram o grupo controlo ($84.28 \pm 24.66\%$) como aquele que apresentou a taxa de permeabilidade mais elevada durante o período experimental logo seguido pelo grupo PVA/Dx/MSCs ($68.33 \pm 27.39\%$). No entanto, conseguiu-se pela primeira vez manter permeável uma prótese vascular de PVA/Dx durante um período máximo de 24 semanas com a superfície luminal revestido por um endotélio funcional.

ABSTRACT

This study was intended to preclinical studying a vascular prosthesis made with a hydrophilic polymer, polyvinyl alcohol hydrogel (PVA) and a polysaccharide, dextran (Dx) in an animal model anatomically and physiologically closer to humans. The vascular prosthesis was produced with a low diameter (inner diameter of 5 mm) in order to anastomose with an artery of equivalent diameter to simulate revascularization procedures done in clinical practice. Historically, low diameter synthetic prostheses always showed worse functional outcomes than autologous grafts of equivalent diameter for several reasons of biological, mechanical and structural origin. It was also our objective to characterize the biocompatibility and blood - materials interactions PVA/Dx graft *in vitro* and *in vivo* settings before proceeding with its functional and structural testing in an animal model. At the same time, we investigated the influence of the association of a cellular system, mesenchymal stem cells (MSCs) derived from the Wharton jelly of the umbilical cord in the functional/structural performance and biocompatibility of PVA/Dx graft to the surrounding tissues.

The copolymer polyvinyl alcohol and dextran were never been tested before in this application. This copolymer was produced in the ratio of 90:10 (PVA/Dx) through a process of physical crosslinking by the method of freeze / thawing. With the aim of enhancing the crosslinking process, grafts were subjected to an annealing process to improve the mechanical characteristics in order to withstand adverse physical environment posed by the pulsatile blood pressure.

The animal model chosen for the *in vivo* experiments was the sheep (*Ovis aries*). Biocompatibility study was performed in sheep with a maximum duration of 32 weeks. One group of animals (group 1) was implanted subcutaneously with PVA disks with 15.5 mm diameter and a second group (group 2) was implanted subcutaneously with PVA discs covered with a confluent monoculture of human MSCs derived from Wharton's jelly. The third group was implanted with membranes PVA /DX with the same diameter. It was also included a negative control group (sham surgery) of 6 animals as required by the ISO 10993-6 standard. The positive control group (Group 5) was implanted subcutaneously with disks of expanded polytetrafluoroethylene with an area equivalent to the implanted PVA membranes. The membranes were retrieved with the surrounding tissues at various time points up to a maximum period of 32 weeks. The samples were subsequently analyzed for inflammatory reaction following the guidelines of the ISO 10993-6 standard (Annex E). After analyzing the results, PVA/Dx proved to be a biomaterial with potential to be used in vascular reconstruction. Concerning the biocompatibility, the results showed that the PVA, the PVA and dextran covered by human MSCs isolated from Wharton's jelly of the umbilical cord PVA are

only slightly irritating to the surrounding tissues in accordance with ISO 10993-6 (standard Annex E) .

In the study of blood - biomaterial interactions, membranes of PVA/Dx with dimensions equal to mentioned above, were used. As a positive control glass beads or slides were used. For negative control polypropylene membranes were chosen. These samples were tested *in vitro* with whole blood, platelet-rich plasma and platelet poor plasma obtained from sheep and humans. The determination of the hemolysis index showed that PVA/Dx as a non-hemolytic biomaterial (0.014 %) being safe for application to contact with blood. The thrombogenicity of PVA/Dx was evaluated by quantitation of platelet adhesion/activation through several tests: lactate dehydrogenase activity measurement, flow cytometry and quantification of whole blood clotting time. Additionally, platelet morphology was observed by scanning electron microscopy (SEM) after contact with different surfaces used in the study. The results of these tests showed that platelet activation and adherence were very satisfactory being even lower than those of the positive control. The results of these parameters were then confirmed by analysis of SEM images, where morphologically platelets adsorbed on the membranes of PVA/Dx had a phenotype of low activation. Activation of the coagulation cascade was also evaluated in the context of blood - materials interactions, through the measurement of plasma recalcification profiles and levels of generated thrombin - antithrombin complex confirming the PVA / Dx is a biomaterial that induces a weak activation of the coagulation cascade. The hemocompatibility of biomaterial PVA/ Dx was subsequently evaluated *in vivo* in two groups of sheep implanted with 5 and 7 cm PVA/Dx vascular prostheses respectively with six animals each. Blood was collected at various time points up to a maximum of 16 weeks, having evaluated several hematologic and coagulation parameters, reinforcing the results obtained *in vitro*. These results confirmed the capability of the PVA/Dx as a material for biomedical applications contact the blood.

In the final phase of functional characterization of PVA/Dx grafts, we proceeded to its implantation in the left common carotid artery through an end-to-end anastomosis. Twenty-four sheep were used in this functional assay. Eighteen animals were allocated to groups using PVA/Dx grafts. A group of six animals in addition to the vascular graft was also given a perivascular MSCs injection at the site of anastomosis. Another group of six animals was treated with anticoagulation protocol. Additionally, a group of sheep was implanted with grafts of PVA/Dx without administration of anticoagulants and MSCs. Finally, in the control group were used ePTFE grafts. Functional assessment was performed using ultrasound on B and Doppler mode at several time points, beginning at 24 hours post- surgery and ending at 24th week. The results of the

patency rates showed that the control group ($84.28 \pm 24.66\%$) had the highest patency rate during the trial period followed by the patency rate of PVA/Dx/MSCs ($68.33 \pm 27.39\%$) group. However, if it was possible to maintain permeable the first vascular PVA/Dx graft for a period of 24 weeks with the luminal surface coated with a functional endothelium.

RÉSUMÉ

Avec ce travail il a été prétendu que nous étudions pré-cliniquement l'utilisation d'une prothèse vasculaire de polymère hydrophilique polyvinil alcool hydrogel (PVA) et de polysaccharide de dextrane (fait à partir d'un modèle animal dont l'anatomie et la physiologie est près de l'homme). La prothèse vasculaire a été produite avec un bas diamètre (diamètre interne égal à 5mm). Comme objectif d'assembler avec une artère de diamètre équivalente pour pouvoir procéder à la revascularisation que nous rencontrons dans la partie clinique. Historiquement les prothèses synthétiques de bas diamètre ont toujours présenté les peu résultats fonctionnels de que les autogreffes de diamètre équivalente pour diverses raisons d'ordre biologique, mécanique et d'ordre structurel. Il s'est prétendu étudié les caractéristiques de la biocompatibilité et les interactions sang- matériel *in vitro* et *in vivo* de la prothèse de PVA/Dx avant de procéder à son test fonctionnel et structural du modèle animal. Parallèlement nous avons examiné l'influence de l'association d'un système cellulaire, les cellules, souches mésenchymateuses (MSCs) obtenues à partir d'une gelée de Wharton du cordon ombilical afin de représenter fonctionnellement, structurellement et dans la biocompatibilité en relation aux tissus enveloppés. Le co-polymère polyvinil alcool hydrogel et dextrane jamais avant resté dans application a été produit de 90:10 à travers un processus de réticulations physiques par la méthode de congélation/décongélation. Visant à améliorer la réticulation, les prothèses ont été soumises à un traitement de *annealing* pour améliorer les caractéristiques mécaniques avec l'objectif de résister à l'environnement physique défavorable posé par la pression artérielle pulsatile. Le modèle animal choisi pour l'expérience *in vivo* a été le mouton (*Ovis aries*). Il a été réalisé une étude de biocompatibilité chez les ovins d'une durée maximale de 32 semaines. Un groupe d'animaux (groupe 1) a été implanté en sous-cutané, avec les disques de PVA/DX avec le même diamètre. Il a également été inclus en tant que groupe contrôle négatif de 6 animaux comme requis par la norme ISO 10993-6. Le groupe contrôle positif (groupe 5) a eu une implantation sous-cutanée avec des échantillons de disques polytétrafluoroéthylène expansé (Maxiflorm ePTFE vasculaire prothèses, Vascutek Ltd, Écosse) avec une surface équivalente aux membranes implantées de PVA.

Les membranes ont été recueillies avec le tissu enveloppé à divers moments sur une période maximale de 32 semaines. Les échantillons ont ensuite été analysés pour la réaction inflammatoire en suivant les lignes directrices de la norme ISO 10993-6 (annexe E). Après l'analyse des résultats PVA/Dx il a été démontré être un biomatériau potentiel pour être utilisé dans la reconstruction vasculaire.

En relation à la biocompatibilité, les résultats démontrent que la PVA, le PVA avec dextrane et le PVA couvert par des MSCs humaines sont légèrement irritants pour les tissus environnants selon l'accord ISO 10993-6 (annexe E).

En ce qui concerne l'étude d'interaction sang-biomatériau il a été utilisé des membranes de PVA/Dx dans les dimensions mentionnées précédemment, ont été utilisées comme contrôle négatif des membranes de polypropylène. Ces échantillons ont été testés in vitro avec du sang total, plasma riche en plaquettes et avec du plasma pauvre en plaquettes provenant de moutons et humains.

La détermination de l'hémolyse démontre que la PVA/Dx est un biomatériau non hémolytique (0,014%) étant sûr pour les applications venant en contact avec le sang. La thrombogénicité du PVA/Dx a été évaluée par la quantification de l'adhésion/activation au moyen d'essais: mesure de lactate déshydrogénase; cytométrie en flux et la quantification du temps de coagulation du sang total. En outre la morphologie des plaquettes a été observée par microscopie électronique (SEM) après contact avec différentes surfaces utilisées dans l'étude.

Les résultats de ces tests ont montré que l'activation des plaquettes et l'adhérence sont des résultats très satisfaisants étant même plus bas que le contrôle positif. Les résultats de ces paramètres ont ensuite été confirmés par l'analyse des images SEM où morphologiquement les plaquettes absorbées dans les membranes de PVA/Dx présentaient un phénotype de faible activation. L'activation de la cascade de la coagulation a été évaluée dans le cadre des interactions du sang-matériau, avec le recours à la mesure de profils de recalcification du plasma et des niveaux de formation du complexe thrombine-antithrombine. Nous confirmons le PVA/Dx comme biomatériau qui induit une faible cascade d'activation et de coagulation.

Par la suite nous avons évalué l'hémocompatibilité de biomatériau PVA/Dx in vivo en deux groupes de moutons avec implantations de prothèse vasculaires de PVA/Dx de 5 à 7 cm avec respectivement six animaux chacun. Le sang a été recueilli à divers points temporels, jusqu'à un maximum de 16 semaines en estimant différents paramètres hématologiques et de la coagulation, ce qui confirme les résultats obtenus in vitro et qui renforce la capacité du PVA/Dx en tant que matériau pour des applications biomédicales qui sont en contact avec le sang. Dans la phase finale de la caractérisation fonctionnelle du PVA/Dx nous avons procédé à son implantation dans l'artère carotide commune gauche par une anastomose haut de gamme et vingt quatre moutons adultes ont été utilisés pour cet essai fonctionnel.

Dix huit animaux ont été répartis aux groupes qui ont utilisé des prothèses de PVA/Dx. Au-delà de la greffe vasculaire un groupe de six animaux ont reçu également un MSC périvasculaire à l'endroit des anastomoses. Un autre groupe de six animaux a

été traité avec un protocole d'anticoagulation. En outre, un groupe de moutons a été implanté avec des greffes de PVA/Dx sans administration d'anticoagulants et de MSCs. Enfin, dans le groupe contrôle, nous avons utilisé des greffes en ePTFE. L'évaluation fonctionnelle a été effectuée en utilisant l'échographie Doppler en mode B en divers points temporels, en commençant à 24 heures après l'intervention chirurgicale jusqu'à la semaine 24. Les résultats des taux de perméabilité au cours de la période d'essai ont été suivis par le groupe PDA/Dx/MCSc ($68,33 \pm 27,39\%$). Cependant, nous avons réussi pour la première fois de maintenir perméable une prothèse vasculaire PVA/Dx durant une période maximum de 24 semaines avec la surface luminale revêtue d'un endothélium fonctionnel.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Histologia e anatomia vascular.

Torna-se relevante antes de iniciar o estudo de uma prótese vascular, realizar uma revisão bibliográfica da estrutura do tecido vascular e fisiologia do sistema cardiovascular.

Do coração saem as artérias, que se espalham por todo o organismo e vão diminuindo de calibre até se transformarem em arteríolas finas ou artérias pré-capilares que, por sua vez dão origem a capilares. Estes continuam-se com as vénulas finas ou veias pós-capilares, dando estas em seguida origem às veias que vão aumentando de calibre de até chegarem ao coração novamente. Este sistema é contínuo e é revestido por um endotélio de baixa fricção e ininterrupto.

Os vasos são classificados consoante a estrutura das suas paredes. Com excepção da circulação terminal que está directamente dependente da pressão sanguínea a que está sujeita. A parede dos grandes vasos é constituída por três túnicas: i) a túnica interna ou íntima constituída por um endotélio, uma camada sub-endotelial de fibras de colagénio e uma lâmina ou membrana elástica interna; ii) a túnica média constituída por células musculares lisas, uma lâmina e fibras elásticas e uma lâmina ou membrana elástica externa; e iii) túnica externa ou adventícia constituída por fibras de colagénio e elásticas.

1.2 Sistema arterial.

As artérias têm origem no coração e à excepção das artérias pulmonares transportam sangue oxigenado. São classificados como elásticas, musculares e mistas, segundo a estrutura e composição da sua túnica média (Dyce, et al.,2009).

As artérias elásticas são as que estão normalmente mais próximo do coração, possuem uma túnica média constituída por algumas células musculares lisas e lâminas elásticas muito numerosas espessas e fenestradas, dando assim uma coloração amarelada a estes vasos. As artérias musculares estão mais afastadas do coração e a sua túnica média possui muitas células musculares lisas e menos lâminas elásticas.

À medida que uma artéria se bifurca a superfície total dos dois ramos a que dá origem são nitidamente maiores do que aquela a que lhes deu origem. Entre a emissão de dois

ramos sucessivos, o calibre da artéria mantêm-se uniforme. Apesar da diminuição do calibre dos ramos sucessivos, a árvore arterial apresenta uma capacidade cada vez maior para acomodar sangue afastando-se do coração. O que resulta numa diminuição proporcional da pressão e velocidade sanguínea. Ao nível dos capilares essa pressão é mínima o que facilita as trocas através das finas paredes destes últimos.

A superfície interna das artérias é perfeitamente lisa. No entanto, quando existe retracção da parede observa-se um pregueamento longitudinal da túnica íntima. Na origem de cada colateral e nas bifurcações terminais das arteríolas, observa-se uma fina lâmina semilunar entre cada leito vascular que divide o fluxo sanguíneo e diminui a sua resistência.

A parede das artérias distingue-se pela sua espessura, elasticidade e resistência. Estas características não se manifestam de forma uniforme sobre todas as artérias. As condições funcionais (pressão, resistência e velocidade do fluxo) variam com o nível arterial considerado e a estrutura da parede modifica-se para responder exactamente a estas diferenças. As artérias são formadas por três túnicas sobrepostas: íntima, média e adventícia. A enervação está presente em todas as artérias mas a irrigação apenas se observa nas mais espessas.

A **íntima** por vezes denominada endartéria, é a camada mais interna que contacta directamente com o sangue. É a camada mais fina, lisa e em continuidade com o endocárdio e capilares. A túnica íntima comporta um endotélio formado por células planas de contorno irregular alongadas paralelamente em relação ao eixo longitudinal do vaso. Na parte mais externa do endotélio encontra-se um extracto sub-endotelial formado por uma mistura de fibras de colagénio e elastina associadas a alguns fibrócitos (Junqueira & Carneiro, 2008). Entre a túnica média e o estrato sub-endotelial existe a membrana elástica interna que é fenestrada e permite a passagem de plasma para as partes mais profundas da túnica média.

A **túnica média** é a camada mais espessa das artérias de grande e médio calibre. Esta túnica é formada por lamelas fenestradas de fibras de elastina e colagénio dispostas concentricamente; entre as lamelas encontram-se miócitos orientados circularmente. O limite externo é marcado por uma concentração de fibras elásticas que constituem a membrana elástica externa.

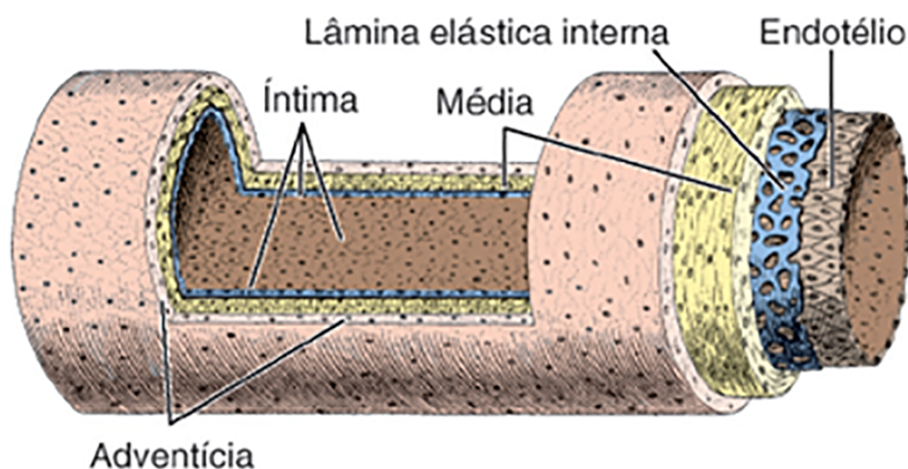


Figura 1- Esquema da estrutura histológica da parede arterial, (adaptado de Junqueira & Carneiro, 2008).

A proporção entre elementos elásticos e musculares varia com o calibre, a função e a localização da artéria. Nas artérias mais próximas do coração (e qualificadas de artérias de grande calibre), as fibras de elastina são predominantes (Dyce, et al., 2009). Entre estas artérias incluem-se: o tronco pulmonar, a aorta e a maior parte dos seus colaterais (Dyce et al., 2009). Estas artérias são designadas de **elásticas**. Funcionalmente, são classificadas como artérias de condução. As artérias deste grupo recebem sangue a pressão elevada e de forma descontinuada a cada sístole o sangue ejetado pelos ventrículos. Após o encerramento das válvulas (aórtica e pulmonar), durante a diástole, as artérias de grande calibre armazenam o sangue que flui para as artérias periféricas. Devido à sua natureza elástica, estas artérias durante a sístole dilatam e aquando da diástole voltam ao seu diâmetro original assegurando desta forma um fluxo regular de sangue para as arteríolas.

As artérias periféricas apresentam uma túnica média rica em miócitos (Junqueira & Carneiro, 2008) e são qualificadas de artérias **musculares**. As artérias que se enquadram nesta classificação são de calibre médio ou pequeno e são também designadas de artérias de distribuição pela capacidade de repartir o sangue no interior dos órgãos. Têm a capacidade de contrair ou relaxar regularizando o fluxo sanguíneo de acordo com as necessidades locais ou regionais. As artérias de localização intermédia são classificadas como **mistas**.

A transição entre artérias elásticas e artérias musculares é geralmente progressiva sem delimitação distinta. No entanto, existem algumas excepções; as artérias renais que são musculares saem directamente, sem transição da parede elástica da aorta abdominal (Dyce et al., 2009).

A **túnica externa ou adventícia** é formada por tecido conjuntivo denso, que se torna mais flexível à periferia confundindo-se com a cápsula fibrosa que envolve os órgãos vizinhos (Junqueira & Carneiro, 2008). Esta camada é relativamente fina nas artérias de grande calibre e mais espessa nas artérias de médio calibre conferindo-lhe mobilidade. A túnica adventícia forma uma lâmina resistente que pode ser utilizada em cirurgia vascular.

A vascularização das paredes arteriais é parcial. As pequenas arteríolas podem assegurar a sua nutrição directamente do sangue com que contactam. A parede das artérias é irrigada por uns vasos de calibre microscópico, os *vasa vasorum*, que são provenientes da artéria que irrigam ou de uma artéria vizinha. Estes vasos não ultrapassam praticamente a adventícia sendo as outras túnicas internas desprovidas de vasos.

A nervosa enervação provem do sistema nervoso autónomo e os nervos formam plexos na adventícia. A quase totalidade das fibras é do tipo amielínico (Junqueira & Carneiro, 2008). As fibras atravessam as fenestrações da membrana elástica externa e ramificam-se na túnica média. Muitas destas fibras formam em torno de grupos de miócitos arborizações terminais do tipo adrenérgico. As artérias são desprovidas de verdadeiras fibras vasodilatadoras: a dilatação arterial resulta de uma inibição das fibras constrictoras que em repouso asseguram o tónus vascular. As fibras sensitivas menos numerosas, são mais frequentes em determinadas zonas da íntima designada de reflogénicas. Na túnica média apesar da presença de fibras nervosas ser mais frequente a sua presença é discreta.

1.2.1 Arteríolas.

As artérias de menor calibre sucedem-se as arteríolas (Junqueira & Carneiro, 2008). Têm um calibre bastante menor que as artérias e a sua túnica média contém algumas, mas poucas células musculares lisas orientadas em espiral. As arteríolas pré-

capilares possuem uma só chamada de células musculares. Os miócitos não formam uma camada contínua mas apenas grupos de miócitos dispostos em anel formando um esfíncter pré-capilar que regula o fluxo e o acesso do sangue à rede capilar(Junqueira & Carneiro, 2008). A adventícia está reduzida a uma fina rede de fibras de colagénio acompanhadas de fibroblastos.

1.3. Sistema venoso.

O sistema venoso apresenta uma capacidade de acomodação do sangue quatro vezes superior ao do sistema arterial. O sangue circula a uma velocidade mais baixa e com uma pressão igualmente mais baixa; o que determina as particularidades da estrutura e conformação das veias. Em geral, o sistema venoso apresenta uma topografia semelhante ao sistema arterial(Dyce et al., 2009).

A maior parte das veias têm uma parede fina, compressível e de aspecto fibroso. As veias quando vazias são flácidas e aplanadas. No entanto em estado de repleção são cilíndricas e moldam-se sobre os órgãos vizinhos. Externamente podem observa-se constrições anulares determinadas internamente pela presença internamente das válvulas (Dyce et al., 2009).

As válvulas são pregas da túnica interna suportadas por um fino prolongamento fibroso da túnica média(Junqueira & Carneiro, 2008). A face parietal da válvula e a parede adjacente da veia delimita o seio da válvula. De acordo com a localização, reconhecem-se dois tipos de válvulas, as **ostiais** situadas na confluência de uma veia com o seu afluente, e as válvulas **parietais**, as mais numerosas situadas ao longo do lúmen da veia (Junqueira & Carneiro, 2008; Dyce et al., 2009). Estas últimas válvulas são geminadas ou seja colocadas em pares enquanto as primeiras existem isoladamente ou pelo contrário agrupadas em conjuntos de três.

Nem todas as veias têm válvulas: as veias pulmonares em todo o seu trajecto, as pequenas veias periféricas e as veias cavas caudal e cranial são totalmente desprovidas de válvulas (Dyce et al., 2009). Na maior parte das espécies, as válvulas são rudimentares ou ausentes na veia porta e veias ázigos. Nas veias dos membros onde o sangue circula contra a força da gravidade; as válvulas são pelo contrário numerosas e completas (Dyce et al., 2009).

As veias de maior calibre apresentam um trajecto rectilíneo enquanto aquelas de calibre médio tem um trajecto mais flexuoso.

Existe um tipo específico de veias, os seios venosos da dura-máter, irregulares e inextensíveis e desprovidos de válvulas, são alojados na espessura desta meninge que substitui a adventícia (Dyce et al., 2009).

As veias de grande calibre são divididas em dois sistemas, um profundo e outro superficial. As veias **profundas** são as mais numerosas e são satélites das artérias do mesmo calibre partilhando as suas relações topográficas. Apenas a veia cava caudal não tem um equivalente arterial. Nos membros, as artérias principais são muitas vezes acompanhadas por duas ou três veias anastomosadas entre si (Dyce et al., 2009). Em geral, este conjunto está alojado dentro de uma bainha conjuntiva comum. Em diversas regiões as veias formam uma rede de anastomoses densa em torno das artérias como uma verdadeira bainha. Ao nível dos órgãos estas redes permitem trocas em contracorrente. Entre estas trocas destacam-se as permutas térmicas entre o sangue venoso proveniente de zonas de temperatura mais baixas em relação á temperatura do sangue arterial (seios venosos da base do crânio e rede venosa do cordão espermático), trocas iónicas (veia renal direita), trocas hormonais (pedículo ovárico). As pulsações arteriais têm ainda uma acção mecânica sobre a circulação venosa (Dyce et al., 2009; Budras, 2007).

As veias **superficiais** ou subcutâneas não têm equivalente arterial mas as de maior calibre são satélites dos ramos nervosos dos membros(Dyce et al., 2009). Entre o sistema venoso superficial e o sistema venoso profundo existem anastomoses que permitem uma derivação de sangue em caso de obstrução momentânea em situações normais ou em caso de obstrução durável por condições patológicas.

A parede das veias tal como as artérias comporta três túnicas(Junqueira & Carneiro, 2008). A **túnica interna** ou íntima também designada de endoveia é um endotélio continuado que repousa sobre uma lâmina basal formada por fibras de colagénio dispostas longitudinalmente. Nas veias, a camada sub-endotelial comporta numerosas

fibras de colagénio e fibras elásticas que são mais frequentes em veias de maior calibre (Junqueira & Carneiro, 2008).

A **túnica média** ou média surge nas veias de armazenamento ou de colecção sob a forma de uma camada incompleta de fibras musculares lisas transversais. Esta camada não está representada verdadeiramente nas veias propriamente ditas. Na túnica média, encontra-se uma ou mais camadas de fibras musculares lisas revestida externamente por fibras de colagénio e elásticas (Junqueira & Carneiro, 2008). A quantidade de fibras musculares varia com as necessidades funcionais locais da veia. As veias da extremidade distal dos membros apresentam 5 a 6 camadas de fibras musculares dispostas circularmente que permitem manter o fluxo de sangue contra a gravidade (Dyce et al., 2009). Estas veias são classificadas como **veias musculares**. Uma musculatura circular similar mas menos desenvolvida existe nas veias da pele e intestino grosso. Nas veias do ovário, do útero e dos corpos cavernosos do pénis as fibras musculares dispõem-se longitudinalmente (Budras, 2007). As veias de maior calibre e em particular as veias cava são do tipo fibroso. Neste tipo de veias, a túnica média é muito fina. As fibras musculares lisas são raras ou ausentes e as fibras de colagénio predominam fortemente. A túnica média está ausente nas veias: do tecido ósseo, da retina, das meninges, da placenta e nos seios da dura-máter (Dyce et al., 2009)

A **túnica externa ou adventícia** nas pequenas veias é uma bainha conjuntiva rica em fibras de colagénio e elastina (Junqueira & Carneiro, 2008). A separação entre fibras de colagénio e elásticas torna-se mais nítida, nas veias de maior calibre (Junqueira & Carneiro, 2008). Nas veias de calibre médio, as fibras elásticas tem uma orientação longitudinal dominante por outro lado as fibras de colagénio formam feixes com orientação oblíqua para unir a túnica média á bainha conjuntiva periférica. Nas grandes veias, a túnica externa é mais espessa que a túnica média, estando preenchida por fibras musculares lisas organizadas em feixes cada vez mais fortes com disposição espiraloide (Junqueira & Carneiro, 2008). Estes feixes são particularmente desenvolvidos na veia cava caudal, na veia porta, nas veias renais e hepáticas (Junqueira & Carneiro, 2008). Alguns feixes de fibras miocárdicas prolongam-se à superfície da parte terminal das veias cava caudal e das veias cardíacas (Junqueira & Carneiro, 2008).

1.3.1. Vénulas.

O sistema venoso tem origem pelas incontáveis vénulas pós-capilares que como o nome indica tem origem directamente na rede capilar. Estes vasos têm cerca de 20 a 25 µm de diâmetro e absorvem parte do plasma intersticial e confluem para as vénulas de armazenamento (*venulae colligentes*) que fazem a transição para as veias propriamente ditas (Junqueira & Carneiro, 2008). A parede das vénulas é formada apenas pela íntima suportada por numerosos pericitos sendo particularmente permeável a linfócitos.

1.4. Capilares.

A parede dos capilares apresenta um vestígio da túnica íntima, nomeadamente um endotélio, uma lâmina basal e uma camada descontínua de pericitos (Budras, 2007). Podem ter três classificações segundo o seu endotélio e funções específicas: capilares com células endoteliais não fenestradas, com células endoteliais fenestradas e com aberturas intracelulares (Dyce et al., 2009; Budras, 2007).

1.5. Anastomoses.

Uma anastomose coloca em comunicação os vasos vizinhos e permite trocas e equilíbrios de pressão. No que concerne as artérias existem dois tipos de anastomoses bem diferentes para a estrutura e função: anastomoses inter-arteriais e anastomoses arterio-venosas.

1.5.1. Anastomoses arterio-venosas.

A anastomose arterio-venosa é um órgão regulador da circulação local em função da actividade desse órgão. Estas anastomoses observam-se em vasos de pequeno calibre. As anastomoses arterio-venosas propriamente ditas encontram-se na pele, na mucosa nasal, na língua, nas vísceras digestivas, nos pulmões, nos órgãos erécteis do aparelho genital, na glândula tiróide e provavelmente em outros órgãos (Junqueira & Carneiro, 2008). Esta estrutura apresenta uma forma de novelo, alimentada por uma curta e fina arteríola aferente que tem origem em ângulo recto a partir de uma arteríola vulgar ou

outro vaso pré-capilar. A arteríola aferente dilata-se e ramifica-se em duas ou três ansas e apresentam uma parede espessa por desenvolvimento de uma manga de células musculares epitelioides dispostas em várias camadas às quais estão associados uma rede de fibrilhas nervosas (Junqueira & Carneiro, 2008). À saída deste novelo de ansas, os vasos diminuem de calibre e dão origem a uma vénula que entrará na rede de veias (Junqueira & Carneiro, 2008). A contracção da parede produz oclusão das ansas e o seu relaxamento permite em razão da diferença da pressão, a passagem de sangue da artéria para a veia. Esta derivação reduz o afluxo de sangue para órgão em repouso. Assim que entram em actividade ocorre oclusão provocando um rápido aumento de sangue arterial.

1.5.2. Anastomoses inter-arteriais.

Relativamente pouco numerosas ao nível das artérias de médio calibre tornam-se mais abundantes em artérias periféricas de pequeno calibre, entre as quais se estabelecem verdadeiras redes. As anastomoses de maiores diâmetros são visíveis a olho nu e apresentam-se sob diversas formas.

Consideram-se **anastomoses de convergência** quando duas artérias se unem em ângulo agudo para formar um novo vaso em geral de maior diâmetro. Na face ventral do tronco cerebral, a artéria basilar é assim formada pela convergência de duas artérias vertebrais (Junqueira & Carneiro, 2008).

Nas **anastomoses em arco**, dois vasos de igual calibre unem-se para formar um arco arterial de onde procedem numerosos vasos mais pequenos (Junqueira & Carneiro, 2008). Ao longo do tubo digestivo existem inúmeras arcadas vasculares assim como nas extremidades dos membros.

As **anastomoses transversas** constituem-se pela comunicação entre dois vasos dispostos paralelamente em relação ao outro, encontram-se nas artérias metacarpianas, metatarsianas ou digitais de numerosas espécies (Dyce et al., 2009).

As **anastomoses mistas** combinam os vários tipos de anastomoses precedentes. São múltiplas e levam à formação de redes vasculares destinadas à assegurar o suprimento vascular em regiões de grande mobilidade como são as articulações.

Outras estruturas importantes com funções semelhantes às anastomoses são as artérias colaterais, ramos que após um certo trajecto, juntam-se de novo ao tronco arterial que lhes deu origem (Budras, 2007). Uma rede *mirabilis* é um plexo de aspecto rendilhado formado pelas divisões de uma artéria, do qual o sangue é drenado sem interposição de capilares por uma ou várias artérias. Este tipo de plexo não existe em todas as espécies e parece ter funções definidas como: reserva sanguínea, regulação circulatória, trocas térmicas e protecção de órgãos frágeis. Formações venosas importantes estão por vezes associadas a esta estrutura.

2. Fisiologia dos vasos sanguíneos.

A parte arterial da circulação fornece sangue de forma continuada aos tecidos em condições de elevada pressão hidroestática. As artérias são estruturas pouco complacentes devido à sua parede espessa (i.e não distendem facilmente com aumentos na pressão sanguínea) e por essa razão a pressão arterial mantém-se elevada com o coração ao ejectar sangue para as artérias.

A regulação da pressão arterial é um processo complexo que envolve respostas autonómicas, reflexos neurais, hormonas e substâncias parácrinas. As arteríolas constituem a parte terminal da rede arterial de vasos. Devido à sua localização constituem uma válvula unidireccional que regula o fluxo sanguíneo entre as artérias e a rede capilar. Os nervos simpáticos (indutores de vasoconstricção) que enervam o músculo liso da parede das arteríolas constituem um mecanismo de regulação do fluxo sanguíneo. No entanto, o grau de vasodilatação ou vasoconstricção é regulado por diversas substâncias vasoactivas. Estes agentes podem ser produzidos localmente (acção parácrina) ou podem chegar pela circulação sistémica. Entre as substâncias com acção parácrina encontra-se o dióxido de carbono, o ácido láctico e a adenosina que são tipicamente vasodilatadoras. A produção destas substâncias aumenta quando o metabolismo celular local de determinada área se eleva emparelhando o aumento da taxa metabólica com a elevação do fluxo vascular. O processo através do qual os mecanismos locais regulam o fluxo sanguíneo localmente designa-se de auto-regulação.

A pressão arterial resulta do produto do *output* cardíaco pela resistência vascular total. Para compreendermos melhor esta função, a pressão depende da quantidade de sangue

que o coração ejecta para o sistema vascular e da taxa a que o sangue consegue fluir através deste sistema. A resistência das arteríolas é o factor que mais contribui para a resistência vascular total, regulando o volume de sangue que sai das artérias. O trabalho cardíaco e o grau de constrição arteriolar são os dois principais determinantes da pressão arterial média (PAM). Alterações na PAM, ocorrem por variação de um destes factores ou da combinação dos dois. Qualquer substância (hormona ou agente parácrino) ou reflexo neural que tenha actividade sobre a função cardíaca ou a contracção do músculo liso das arteríolas tem o potencial de alterar a PAM.

Em situações normais o volume sanguíneo e a pressão arterial estão directamente relacionadas. Alterações no volume cardíaco produzem variações no output cardíaco e consequentemente na PAM.

2.1. Controlo humoral da circulação.

O controlo humoral da circulação refere-se ao controlo da circulação através de substâncias secretadas ou absorvidas pelo fluídos orgânicos como hormonas e iões. Algumas destes compostos são sintetizadas por glândulas e transportados através do sangue por todo o organismo (acção endócrina). Outros são sintetizados localmente e causam efeitos vasculares locais (acção parácrina e autócrina). Os factores com acção na função circulatória dividem-se em dois grupos; os que causam vasodilatação e os que causam vasoconstrição.

2.1.1. Vasodilatadores.

2.1.1.1. Péptidos com acção na regulação vascular.

Os péptidos natriuréticos (PN) são uma família de hormonas derivadas do coração e vasos que desempenham um papel relevante na homeostasia cardiovascular através da regulação do volume e pressão sanguínea. A actividade fisiológica destes péptidos vai para além da clássica acção endócrina regulando a pressão sanguínea. Estes péptidos exercem também um efeito autócrino e parácrino na circulação em situações patológicas e normais, regulando a secreção de renina, a libertação de progesterona, a secreção de endotelina e de vasopressina (Barrett, Barman, Boitano, & Brooks, 2012). Os mamíferos produzem 4 tipos de péptidos natriuréticos: o péptido natriurético atrial (PNA), o péptido natriurético do cérebro (PNC), o péptido natriurético do tipo C e o péptido natriurético do

tipo *dendoaspis*. Os PN exercem os seus efeitos fisiológicos pela ocupação de três receptores membranários: NPR-A, NPR-B e NPR-C. Os dois primeiros sub-tipos, são receptores associados à enzima guanilato ciclase que converte guanosina trifostato em guanosina monofostato cíclica (cGMP), considerando-se esta molécula a efectora intracelular das acções dos PN.

Adicionalmente os péptidos natriuréticos tem acções em células não-vasculares envolvendo acções nos túbulos renais e células mesangiais, inibição de libertação da renina, vasopressina e aldosterona(Barrett et al., 2012). Um número importante de acções sistémicas atribuídas aos PN leva a uma redução da resistência vascular periférica. Estes efeitos ocorrem por uma acção directa na parede dos vasos como o efeito vasodilatador dos PN nas arteríolas renais aferentes, que leva a um aumento da filtração glomerular com subsequente diurese. Os efeitos vasculares destes péptidos podem também ser mediados pela regulação do tónus simpático e libertação de catecolaminas pelos neurónios simpáticos periféricos(Barrett et al., 2012).

As acções vasodilatadoras directas dos PN são medidas pela acção da enzima cinase associada a cGMP. Esta enzima leva à abertura de canais iónicos nas células musculares lisas induzindo hiperpolarização e relaxamento vascular. O cGMP interfere na homeostasia do cálcio reduzindo Ca^{2+} intracelular através da diminuição da libertação das reservas intracelulares de cálcio e através da remoção do cálcio pela sequestração nas reservas intracelulares e pelo aumento da extrusão através membrana citoplasmática(Barrett et al., 2012). Outro mecanismo para a vasodilatação induzida pelos PN, baseia-se na activação das fosfodiesterases. As referidas enzimas diminuem as concentrações intracelulares de adenosina monofostato cíclica (cAMP) e consequentemente inibem as acções medidas por este mensageiro tais como o aumento do cálcio intracelular e respectiva contracção das células musculares lisas (Barrett et al. 2012).

Ao nível do coração para além dos efeitos inotrópicos cardíacos, todos os PN induzem efeitos vasorelaxantes na circulação coronária(Supaporn et al., 1996). Os estudos focaram-se na administração de PNA em modelos caninos e felinos onde exerceu uma acção vasodilatadora coronária dependente da dose (Chu, et al., 1989) (Yanagisawa, et al., 1987; Yanagisawa & Lefer, 1988).

Os PN, através do péptido natriurético do tipo C inibem a proliferação e o crescimento de células musculares através da ocupação do receptor NPR-B (Porter, et al., 1992). Os efeitos antiproliferativos deste péptido foram demonstrados *in vivo*, inibindo o espessamento da túnica íntima induzida pela proliferação de músculo liso vascular característica das lesões vasculares (Brown, Chen, & Hong, 1997).

As **cininas** incluem dois péptidos a bradicinina e a lisilbradicinina. A lisilbradicinina pode-se converter em bradicinina por uma aminopeptidase. As cininas resultam da activação de duas proteínas precursoras o cininogénio de alto peso molecular (CAM) e o cininogénio de baixo peso molecular (CBM) pela acção de um grupo de protéases designado de calicreínas (Sharma, 2013). O calicreína tecidular existe na membrana apical das células em diversos tecidos (ex: pâncreas, rim, glândulas salivares, intestino e próstata) e a calicreína plasmática que circula de forma inactiva no sangue (Tang, Leung, & Lai, 2011). A calicreína tecidular actua sobre o CBM e CAM para forma lisilbradicinina enquanto a calicreína plasmática quando activada actua sobre o CAM formando bradicinina. Por sua vez as calicreínas resultado da activação de um precursor, a precalicreína pela acção do factor XII da via intrínseca de coagulação que inicia uma ansa activadora de feedback positivo, já que a calicreína também activa o factor XII e o CMA também apresenta uma acção activadora sobre este factor da coagulação. A acção das cininas é semelhante à da histamina sendo essencialmente hormonas tecidulares embora também sejam detectadas em pequenas concentrações no plasma. Estes compostos embora causem contracção muscular lisa em diversas vísceras contrariamente induzem o relaxamento músculo liso vascular através da síntese do óxido nítrico (NO) baixando a pressão arterial. Adicionalmente aumentam a permeabilidade capilar, induzem a quimiotaxia de leucócitos e causam dor. As acções vasculares das cininas são mediadas pela acção no receptor B₂, enquanto que as acções de estímulo da dor passam pela mediação do receptor B₁.

2.1.1.2. Derivados do ácido araquidónico.

As epoxigenases do citocromo P-450 (CYP) metabolizam o ácido araquidónico (AA) em ácidos epoxieicosatrienoicos (AEC). Na última década, os AEC foram considerados por vários laboratórios como sendo moléculas que se enquadram num grupo mais lato, os factores hiperpolarizantes derivados do endotélio (FHDE) com propriedades de relaxamento do músculo liso vascular em várias espécies, incluindo o homem. Contudo, na aorta e artérias mesentéricas do coelho e em diversas artérias de outras espécies tais

como o cão, o rato e porco, a produção de AEC está ausente em condições fisiológicas normais. Ainda assim, o AA produz vasodilatação sugerindo que existem outros metabólitos do AA para além dos AEC possam actuar como FHDE. Estes metabólitos foram identificados como produtos da via metabólica da lipoxigenase. A hidrólise do grupo epóxido dos AEC por epoxihidrolases leva a formação de ácidos dihidroieicosatrienoicos (DAEC)(Larsen et al., 2006). Os AEC são metabolicamente mais activos que os seus metabolitos e funcionam não só como vasodilatadores e mas também como agentes de protecção vascular. Estes metabólitos, inibem a adesão plaquetária(Krötz et al., 2004), a proliferação de células musculares lisas(Sun et al., 2002) e reduzem a inflamação da parede do vaso(Node et al., 1999). O seu mecanismo de acção baseia-se na abertura de canais de potássio activados por cálcio (Larsen et al., 2006).

2.1.1.3. Outros autacoides com acção vascular.

O endotélio desempenha um papel principal na homeostasia vascular através da libertação de autacoides vasoactivos como o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI_2)(Hecker, 2000). A síntese basal destes autacoides é aumentada pela presença de receptores dependente de agonistas como a acetilcolina, a bradicina e a histamina bem como por estímulos independentes de receptores como a hipoxia, o aumento da tensão tangencial ou a deformação celular. A tensão tangencial induz do aumento do NO que é independente do aumento do cálcio intracelular (Hecker, 2000). O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} é um denominador comum da produção endotelial de autacoides porque a fosfolipase A_2 (enzima implicada na síntese de PGI_2) e a NO sintetase são enzimas dependentes de Ca^{2+} . O endotélio pode iniciar a vasodilatação pela actividade da NO sintetase sobre o aminoácido L- arginina, produzindo NO. O relaxamento muscular dá-se pelo aumento intra-celular de potássio. Ao contrário dos factores hiperpolarizantes derivados do ácido araquidónico, nos autacoides os efeitos hiperpolarizantes na célula são mediados por canais de potássio (CK) activados por ATP, CK activados por cálcio e igualmente por CK de rectificação tardia (Hecker, 2000).

O **anandamina** foi descrito como sendo um factor derivado do metabolismo do ácido araquidónico (Chataigneau et al., 1998). Estudos subsequentes demonstraram que este metabólito é um fraco factor hiperpolarizante e os seus efeitos nos canais de potássio das células musculares lisas podem diferencia-los claramente de outros FHDE (Chataigneau

et al., 1998). Outro factor que tem sido invocado como contribuinte da hiperpolarização das células musculares lisas, é o K^+ libertado para espaço intercelular pelas células endoteliais quando os canais de potássio activados por cálcio são abertos por acção dos AEC(Edwards, et al., 1998).

A vasodilatação é de longe, o mais importante efeito vascular da histamina e envolve os receptores H1 e H2 distribuídos ao longo dos vasos de resistência na maioria dos leitos vasculares, no entanto, as diferenças quantitativas são evidentes no grau de dilatação que ocorre em vários leitos. A activação quer do H1 ou H2 tipo de receptor de histamina pode provocar vasodilatação máxima, mas as respostas diferem na sua sensibilidade para a histamina, na duração do efeito, e no mecanismo da sua produção. Os receptores H1 tem a maior afinidade para histamina e medeiam uma resposta vasodilatadora que é relativamente rápida mas de curta duração. Por contraste, a activação dos receptores H2 provoca vasodilatação que se desenvolve de forma mais lenta e progressiva. Os receptores de H2 são localizados nas células do músculo liso vascular, e os efeitos vasodilatadores produzidos pela sua estimulação são mediadas por AMP cíclico. Por outro lado os receptores H1 localizam-se em células endoteliais, e a sua estimulação conduz à formação de substâncias vasodilatadoras locais como o NO e prostaciclina (PGI_2)(Wong, Wilkins, & Minson, 2004) (Lüscher, et al., 1990). Existem também diferenças na resposta

2.1.1.4. Óxido nítrico (NO).

A produção endotelial de NO pode ser desencadeada por receptores específicos (por exemplo, os receptores muscarínicos, receptores de bradicinina e receptores de histamina) ou por deformação mecânica, resultante da tensão tangencial ou por tensão pulsátil causada pelo fluxo de sangue (Franchini, Cestari, & Krieger, 1994; Heesch, Thames, & Abboud, 1984). O NO provoca vasodilatação tanto das artérias coronárias como das artérias do epicárdio em resposta ao aumento do fluxo de sangue, *in vitro*(Iwamoto, et al., 1992) e contribuem para hiperemia reactiva coronária *in vivo* (Rubanyi, et al., 1990). No endotélio coronário normal a vasodilatação ocorre pela acção da NO sintase constitutiva que atua sobre L- arginina para a produção de NO, provocando este o relaxamento vascular do músculo liso por meio de um aumento do cGMP com consequente activação dos canais de potássio activados por canais de cálcio (KCA) e possivelmente pelos canais de potássio activados por ATP(Rubanyi et al., 1990).

A contribuição de NO para a manutenção do fluxo sanguíneo coronário foi estudada através da administração de análogos de L-arginina que agem como inibidores competitivos da síntese de NO. Estudos *in vivo* realizados em cães têm mostrado nenhuma mudança (Rubanyi et al., 1990; Rogerson, et al., 1993) ou apenas uma pequena diminuição (Petersen, Hinojosa-Laborde, & DiBona, 1993) de fluxo coronário em resposta aos inibidores da síntese de NO, durante condições basais de fluxo. Em suínos anestesiados (Imai, Nolan, & Johnston, 1983) ou despertos (Dibner-Dunlap, Kinugawa, & Thames, 1993), a inibição da síntese de NO resultou numa pequena diminuição do fluxo de sangue coronária que foi acompanhada por um aumento de extracção do oxigénio e uma diminuição da tensão do oxigénio venoso coronário. No coração humano, NO endógeno exerce uma influência vasodilatadora modesta sobre os vasos coronários em condições de repouso (Messina, Rodenburg, & Kaley, 1989). Estes dados significam que em condições de repouso, o efeito de inibição de NO sintase pode ser anulado pela dilatação arteriolar compensatória mas sugerem que esta dilatação basal das arteríolas coronárias pode limitar novos aumentos induzidos pelo exercício no fluxo sanguíneo coronário. Existem evidências de que durante o exercício, a produção coronária de NO está aumentada no coração do cão (Persson, et al., 1990), provavelmente devido a um aumento da tensão tangencial sobre as células endoteliais em resultado do aumento das taxas de fluxo coronário. Além disso, a libertação de NO pelos eritrócitos pode ser estimulada no coração canino durante o exercício, em resposta à diminuição da tensão de oxigénio intravascular (Panza, et al., 1993). Todas estas observações sugerem que o NO pode contribuir para o aumento do fluxo sanguíneo coronário durante o exercício.

2.1.2. Vasoconstrictores.

2.1.2.1. Endotelinas.

As endotelinas são polipéptidos produzidas pelas células endoteliais, foram caracterizadas pela primeira vez por Yanagisawa et al em 1988 (Yanagisawa et al., 1988) e distinguem-se três tipos (I a III). A **endotelina-1 (ET-1)** constitui o vasoconstrictor mais potente actualmente conhecido, pensa-se que actue de forma mais marcada nas vénulas. A sua influência local é mais marcada do que os seus efeitos sistémicos, uma vez que os níveis plasmáticos desta endotelina são de apenas 1,5 pg/ml. (Stewart, et al., 1991). A sua acção local parácrina ocorre por difusão para a túnica média dos vasos onde estimula a contracção muscular. A endotelina-1 é produzida no cérebro, rins e células

endoteliais. É secretada para o exterior da célula na forma inactiva sendo activada posteriormente pela enzima conversora da endotelina. A produção deste composto endotelial pode ser induzida pela interacção das células endoteliais com os leucócitos, plaquetas e outros constituintes do sangue. As endotelinas não se armazenam em grânulos no interior do citoplasma e os factores que alteram a transcrição do gene induzem prontamente a produção pelas células endoteliais.

2.1.2.2. Angiotensina II.

A angiotensina II é uma substância vasoconstrictora em que os efeitos sistémicos através do sistema renina-angiotensina são conhecidos de longa data. A angiotensina II é formada a partir da angiotensina I pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina I por sua vez é formada pela acção da renina renal sobre o angiotensinogénio (Barrett et al., 2012). A produção de angiotensina II está aumentada quando ocorre uma diminuição na pressão arterial ou no volume do fluido extracelular. Nestas situações ocorre um aumento da produção de renina pelo rim que desempenha um papel fundamental na manutenção da pressão arterial em níveis normais. A angiotensina II aumenta a ingestão de água e induz também um aumento na síntese de aldosterona contribuindo para o aumento do volume do fluido extracelular (Barrett et al., 2012). Apesar de ser libertado na circulação sistémica também existe uma produção local que interacciona com outras substâncias produzidas localmente no endotélio (Berry, et al., 2001). A angiotensina II tem um efeito vasoconstrictor sobre o músculo liso e tem um efeito estimulador na síntese de prostaglandinas. Este efeito antagónico na acção é contrabalançado no estímulo da síntese de substâncias antagónicas, sendo este mecanismo mais um elemento no equilíbrio local do binómio vasoconstrição-vasodilatação.

2.1.2.3. Vasopressina.

A arginina-vasopressina é uma hormona polipeptídica, armazenada e sintetizada no lobo posterior da hipófise (Barrett et al., 2012). A sua principal função fisiológica é a retenção de água pelo rim através do aumento de permeabilidade dos ductos colectores fazendo água regressar aos interstícios hipertónicos das pirâmides renais (Barrett et al., 2012). Apresenta também uma acção vasoconstrictora por ligação aos receptores V_{1A} . *In vitro* é um potente vasoconstrictor contudo *in vivo* são necessárias grandes quantidades para

e elevar a pressão arterial (Barrett et al., 2012). Esta última situação deve-se à acção da vasopressina ao nível dos centros de controlo cardiovascular ocorrendo uma diminuição compensatória no volume de ejeção cardíaca que se traduz por uma alteração ligeira na pressão arterial (Barrett et al., 2012).

2.1.2.4. Urotensina II.

É um polipéptido isolado pela primeira vez da espinal medula de peixes (Pearson et al., 1980), estando também presente no tecido cardíaco e vascular de mamíferos (Zoccali & Mallamaci, 2008; Langham & Kelly, 2013). É considerado o vasoconstritor mais potente actualmente conhecido em mamíferos (Ross, et al., 2010). Quando comparado com outros péptidos vasoactivos como as endotelinas, exibe semelhanças funcionais, nomeadamente porque ambos produzem uma vasoconstrição dependente de uma contracção forte da musculatura lisa dos vasos e produzem também uma fraca vasodilatação dependente do endotélio. Os níveis circulantes de urotensina II (UT-II) são bastantes baixos tal como acontece com a ET-1 e os seus receptores encontram-se dispersos pelo corpo (Yoshimoto, Matsushita, & Hirata, 2004). Tal como os receptores da angiotensina II e ET-1, os receptores da UT-II encontram-se acoplados às proteínas G (Yoshimoto et al., 2004). Os seus receptores encontram-se associados e ao contrário da ET-1 e angiotensina II, UT-II parece ter efeitos mínimos na pressão arterial e frequência cardíaca (Affolter et al., 2002). Os seus efeitos vasoconstritores aparentemente são ineficazes nas veias, ao contrário de ET-1 (Maguire & Davenport, 2002).

2.1.2.5. Catecolaminas.

A adrenalina, noradrenalina e dopamina catecolaminas são aminas produzidas pela medula da glândula adrenal. A catecolamina excretada em maior quantidade para a veia adrenal é a adrenalina (Barrett et al., 2012). A noradrenalina também entra na circulação através da libertação das terminações nervosas noradrenérgicas (Barrett et al., 2012). A noradrenalina e adrenalina causam vasoconstrição na maioria dos órgãos através dos receptores α_1 . Existindo no entanto uma excepção nos vasos sanguíneos do músculo-esquelético e fígado, onde a adrenalina por interacção com os receptores B_2 induz vasodilatação (Barrett et al., 2012). Quando a noradrenalina é infundida lentamente a pressão sistólica e diastólica aumenta. A hipertensão estimula os reflexos baroreceptores carotídeo e aórtico produzindo uma bradicardia reflexa que anula os efeitos directos

cronotrópicos positivos da noradrenalina. A **adrenalina** causa aumento da amplitude de pulso, mas como a estimulação do reflexo baroreceptor arterial é insuficiente para anular o efeito desta hormona no coração, a frequência cardíaca e o volume de ejeção aumentam(Barrett et al., 2012). A função fisiológica da **dopamina** na regulação da circulação não é ainda totalmente conhecida. No entanto, quando se administra dopamina por via endovenosa ocorre vasodilatação renal e mesentérica por interacção com um receptor dopaminérgico(Barrett et al., 2012). Noutros tecidos provavelmente causará vasoconstrição por induzir a libertação de noradrenalina(Barrett et al., 2012). Tem ainda um efeito inotrópico positivo no coração por acção nos receptores B₁-adrenérgico(Barrett et al., 2012). O efeito final pela administração de doses moderadas de dopamina será um aumento moderado na pressão sistólica mantendo-se a pressão diastólica inalterada.

2.1.2.6. Tromboxano A₂.

O tromboxano A₂ (TA₂) resulta da acção tromboxano A₂ sintase nos metabólitos PGG₂ e PGH₂ sintetizados a partir do ácido araquidónico por acção da enzima ciclooxygenase (FitzGerald, Pedersen, & Patrono, 1983). Por oposição às prostaciclina, o tromboxano A₂ causa vasoconstrição e agregação plaquetária sendo o principal produto da via das ciclooxygenases sintetizado nas plaquetas (Bauer et al., 1999). Entre as principais compostos que induzem a sua síntese encontra-se o ADP (adenosina difosfato)(Jin, Quinton, Zhang, Rittenhouse, & Kunapuli, 2002). A administração de ácido acetilsalicílico em baixas doses, inibe irreversivelmente a ciclooxygenase, que obviamente reduz a síntese do TA₂ assim como de prostaciclina(Paul, Jin, & Kunapuli, 1999). No entanto como as prostaciclina são sintetizadas nas células endoteliais onde a ciclooxygenase é sintetizada numa questão de horas. Nas plaquetas, a ciclooxygenase só é sintetizada de novo com a entrada em circulação de novas plaquetas.

2.1.2.7. Serotonina.

A serotonina é uma amina com acção sobre o tónus muscular dos vasos. No entanto, poderá exercer vasoconstrição ou vasodilatação dependendo da integridade do endotélio(Barrett et al., 2012). Quando o endotélio está danificado ocorre activação das plaquetas com consequente libertação de serotonina(Barrett et al., 2012). Nesta situação a serotonina interacciona com o receptor 5-HT_{2A} causando uma contracção imediata da

musculatura lisa de qualquer vaso (Barrett et al., 2012). Quando o endotélio está intacto, a serotonina actua sobre os receptores 5-HT_{2B} e 5-HT_{1B} e leva a um aumento do Ca²⁺ que por sua vez activa a NO sintase que produz NO levando a um relaxamento da musculatura lisa do vaso (Bader, 2008).

2.1.3. Regulação sistémica do fluxo sanguíneo pelo sistema nervoso.

Os arcos reflexos com acção vascular têm como função última a homeostasia da pressão arterial e baseiam-se na resposta e integração da informação recolhida pelos receptores nos vasos periféricos, átrios e ventrículos cardíacos.

As arteríolas e outros vasos que contribuem em maior proporção para a regulação da pressão arterial são os vasos mais densamente innervados. Todos os vasos com excepção dos capilares e vénulas contêm músculo liso e recebem fibras nervosas motoras da divisão simpática do sistema nervoso autónomo (SNA). Consequentemente as fibras que enervam os chamados vasos de resistência sistémicos são responsáveis pela regulação do fluxo sanguíneo tecidual e pressão arterial. As fibras que innervam os chamados vasos de armazenagem (veias) fazem variar o volume de armazenado nas veias. A innervação da maioria das veias é escassa, no entanto, as veias esplâncnicas são bem innervadas. A venoconstrição é iniciada por estímulos que também activam os nervos vasoconstrictores das arteríolas. A consequente diminuição do volume de sangue armazenado provoca uma mudança do volume de sangue para o lado arterial da circulação.

Existem dois tipos de fibras que terminam nos vasos dos diversos tecidos do corpo. As fibras noradrenérgicas são vasoconstrictoras na sua função. Adicionalmente à sua innervação vasoconstrictora, as arteríolas e artérias do músculo-esquelético são innervadas por fibras colinérgicas vasodilatadoras que se situam nos nervos simpáticos (o sistema vasodilatador simpático). Para além do músculo-esquelético existem evidências que os vasos sanguíneos do coração, pulmões, rins e útero também recebem este tipo de innervação. Feixes de fibras noradrenérgicas e colinérgicas formam plexos na túnica adventícia das arteríolas dos quais partem fibras que terminam na parte mais externa da camada muscular da túnica média. Os neurotransmissores atingem as camadas mais internas da túnica média por difusão e a contracção propaga-se de uma célula muscular para a outra através de *gap junctions*. As fibras vasodilatadoras apresentam um padrão de despolarização não tónico por oposição as fibras vasoconstrictoras que apresentam

uma actividade tónica. Na maioria dos tecidos, a vasodilatação é produzida pela diminuição da taxa de despolarização nas fibras vasoconstrictoras. Contudo, no músculo-esquelético a vasodilatação também pode ser induzida pela activação do sistema vasodilatador simpático(Barrett et al., 2012). Existem também polipéptidos nas terminações nervosas encontradas nas paredes dos vasos com propriedades vasodilatadoras ou vasoconstrictoras. As fibras colinérgicas contêm *vasoactive intestinal polipeptide* (VIP) que causa vasodilatação(Barrett et al., 2012). Os nervos simpáticos noradrenérgicos posganglionares também contêm o neuropéptido Y que apresenta uma acção vasoconstrictora(Barrett et al., 2012). Outras substâncias vasodilatadoras como a substância P ou *calcitonin gene-related peptide* (CGRPa)(Brain, et al., 1993) são encontradas nas fibras sensitivas de nervos sensoriais que se encontram próximos de vasos sanguíneos (Brain et al., 1993).

2.1.3.1. Controlo vasomotor.

Os nervos simpáticos através dos respectivos neurotransmissores induzem vasoconstrição das arteríolas e veias, aumentam o volume de ejeção cardíaco e a frequência cardíaca. Os impulsos nervosos destas fibras ocorrem de uma forma tónica e a pressão sanguínea é ajustada por variações na frequência da taxa de despolarização. A actividade espinal reflexa também afecta a pressão sanguínea mas o controlo principal da pressão sanguínea é exercido por um grupo de neurónios localizado na *medulla oblongata*, a área ou centro vasomotor(Barrett et al., 2012). Os neurónios que medeiam o impulso simpático para os vasos sanguíneos e coração projectam-se directamente dos neurónios simpáticos pré-ganglionares na coluna intermediolateral da substância cinzenta da espinal medula. De cada lado, os corpos celulares destes neurónios localizam-se junto a superfície meníngea da espinal medula rostral ventrolateral. Os axónios localizam-se dorsalmente e medialmente e descendo na coluna lateral da espinal medula até a coluna intermediolateral. Estes neurónios secretam como neurotransmissor excitatório o glutamato.

Quando a frequência de despolarização vasoconstrictora aumenta, dá-se um aumento na vasoconstrição arteriolar que por sua vez aumenta a pressão sanguínea. Paralelamente ocorre venoconstrição e uma diminuição do armazenamento do sangue na circulação venosa. A frequência cardíaca e o volume de ejeção também activam por aumento de actividade dos mesmos nervos simpáticos no coração. A este aumento de actividade do

sistema simpático está associado uma diminuição da actividade tónica de despolarização das fibras vagais no coração. Por outro lado, uma diminuição da actividade do centro vasomotor causa vasodilatação, uma queda na pressão sanguínea e um aumento de armazenamento de sangue na circulação venosa. Concomitantemente é acompanhado por uma diminuição na frequência cardíaca que se deve à estimulação da inervação vagal do coração.

2.1.3.2. Aferentes do centro vasomotor.

As vias aferentes que convergem para o centro vasomotor incluem fibras dos baroreceptores arteriais e venosos, fibras dos quimiorreceptores carotídeos e aórticos e de outros locais do SNC. Adicionalmente, existem estímulos que actuam directamente no centro vasomotor como a hipoxia e o CO₂. Entre o hipotálamo e o centro vasomotor existem conexões que são recíprocas, com aferentes do tronco cerebral a fechar o circuito. A dilatação dos pulmões aquando da inspiração causa vasodilatação e uma diminuição da pressão arterial através de vias aferentes vagais do pulmão que inibem o tónus vasomotor. A dor é outro estímulo que causa aumento na pressão arterial por impulsos aferentes da formação reticular que convergem para o centro vasomotor. O reflexo somatosimpático reflecte a resposta pressora de estímulos provenientes dos nervos aferentes somáticos cutâneos através de estímulos dolorosos. Impulsos aferentes chegam a medulla rostral ventro-lateral causando um aumento da pressão arterial. A dor visceral por sua vez produz uma resposta depressora da pressão arterial devido à estimulação dos nervos aferentes parasimpáticos vagais e pélvicos. Por sua vez o intestino grosso apresenta uma abundante inervação simpática e pode produzir uma resposta pressora quando estimulado.

2.1.3.3. Baroreceptores.

Os baroreceptores são receptores de tensão que existem nas paredes dos vasos sanguíneos e coração (Barrett et al., 2012). Os receptores do arco aórtico e seio carotídeo monitorizam a pressão arterial e a frequência cardíaca. Existem também receptores localizados nos átrios esquerdo e direito, no início da veia cava caudal e cranial e nas veias pulmonares assim como na circulação pulmonar. Estes últimos receptores que existem na chamada circulação de baixa pressão são designados em conjunto como receptores de cardiopulmonares. Os baroreceptores são estimulados pela distensão das estruturas nos quais se encontram e assim despolarizam a uma taxa mais elevada

quando a pressão nestas estruturas aumentam. As fibras aferentes provenientes dos baroreceptores passam através do nervo glossofaríngeo e vago para o centro vasomotor. Quando a frequência despolarização dos baroreceptores aumenta dá-se uma inibição da despolarização tónica dos nervos vasoconstritores e uma excitação da inervação vagal do coração, produzindo vasodilatação, venodilatação, queda na pressão sanguínea, bradicardia e uma diminuição no volume de ejeção cardíaco.

2.1.3.4. Reflexo baroreceptores do seio carotídeo e arco aórtico.

O seio carotídeo é uma pequena dilatação da artéria carótida interna imediatamente cranial à bifurcação da artéria carótida comum. O baroreceptor localiza-se nesta dilatação e encontra-se também na parede do arco aórtico. Estes baroreceptores situam-se na adventícia e as fibras nervosas aferentes do seio carotídeo formam um ramo distinto do nervo glosso-faríngeo, o nervo do seio carotídeo. Enquanto no baroreceptor situado no arco aórtico, as fibras com origem neste baroreceptor formam um nervo distinto do nervo vago apenas no coelho.

Os baroreceptores respondem a estímulos de pressão pulsátil e pressão média. Uma descida na pressão pulsátil registada no seio carotídeo sem alterações na pressão arterial média diminui a taxa de despolarização do baroreceptor e provoca um aumento na pressão sanguínea e taquicardia (Barrett, et al., 2012). Estes receptores também respondem a flutuações na pressão média, despolarizando com maior frequência nas subidas e permanecendo inactivo nas quedas de pressão média. Os receptores aórticos não foram estudados com tanto detalhe mas pensa-se que as respostas aos estímulos funcionam de forma similar aos baroreceptores do seio carotídeo formando com este último uma unidade funcional. Pela organização funcional dos baroreceptores na porção arterial da circulação, podemos afirmar que este conjunto de receptores constituem um mecanismo reflexo de *feedback* que tem como objectivo estabilizar a pressão arterial e a frequência cardíaca. Assim sendo, uma queda na pressão arterial sistémica diminui a taxa de despolarização destes dois receptores conduzindo a um aumento compensatório na frequência cardíaca e volume de ejeção. A um aumento na pressão produz-se dilatação das arteríolas e diminui-se o volume de ejeção até que a pressão arterial retorne a um nível previamente normal.

2.1.3.5. Reflexo dos baroreceptores cardiopulmonares.

Os receptores localizados nos átrios, ventrículos e vasos pulmonares. Estes receptores protegem contra alterações rápidas no volume intravascular, variando a sua frequência de despolarização exercendo uma acção inibidora sobre o centro vasomotor e adicionalmente também controlam a frequência cardíaca. Os receptores atriais são de dois tipos: tipo A, que despolarizam durante a sístole e tipo B, que despolarizam no final da diástole, no momento do pico de enchimento atrial (Barrett et al., 2012). A frequência de despolarização dos baroreceptores de tipo B aumenta quando aumenta o retorno venoso e diminui pela diminuição do retorno venoso, o que indica que estes receptores respondem principalmente à distensão das paredes atriais. O reflexo que se inicia pela estimulação destes receptores inclui vasodilatação e uma diminuição na pressão sanguínea. Contudo neste reflexo, a frequência aumenta em lugar de diminuir.

Os baroreceptores localizados no ventrículo esquerdo, são estimulados quando são distendidos. Nesta situação ocorre uma queda na pressão arterial e na frequência cardíaca. Para ocorrer esta resposta é necessário que ocorra uma distensão considerável do ventrículo e o seu significado fisiológico é incerto. Contudo, os baroreceptores do ventrículo esquerdo podem desempenhar uma função na manutenção do tónus vagal que mantém o coração em baixas frequências no estado de repouso.

O reflexo de *Bainbridge*, descrito pelo fisiologista inglês com o mesmo nome em 1915, referia um aumento da frequência cardíaca em resposta a uma infusão intravascular rápida de fluídos em animais anestesiados. Este reflexo seria mediado pelos receptores de tensão localizados nos átrios. O ramo aferente deste reflexo pertenceria ao vago enquanto o ramo eferente pertenceria aos nervos simpáticos que terminam no nodo sinoatrial. A frequência cardíaca seria influenciada por duas acções opostas; o reflexo baroreceptor arterial e o reflexo de *Bainbridge*. O factor que determina se a frequência cardíaca sobe ou desce em resposta a um aumento no volume intravascular será provavelmente a frequência cardíaca inicial. Se inicialmente está elevada, tende a descer por acção do reflexo baroreceptor arterial; se pelo contrário de a frequência cardíaca inicial é baixa aumenta por acção do reflexo de *Bainbridge*.

Os baroreceptores pulmonares apesar de mais relacionados com o controlo da respiração quando estimulados também inibem o centro vasomotor quando estimulados (Barrett et al., 2012). Através da dilatação dos pulmões aquando da inspiração, ocorre vasodilatação e uma diminuição na pressão cardíaca.

2.1.3.6. Interação dos baroreceptores com o sistema endócrino na regulação do volume extracelular.

A diminuição do volume do fluido extracelular conduz a uma diminuição da pressão venosa central com consequente diminuição da frequência de despolarização dos receptores de tensão atriais que leva a uma secreção aumentada de vasopressina. Nesta situação a actividade simpática está aumentada o que leva a um aumento na secreção da renina. Esta elevação da renina conduz a um aumento da secreção da aldosterona que por sua vez aumenta a reabsorção renal de sódio com retenção de fluídos. Quando a perda de volume é muito severa, os baroreceptores arteriais despolarizam com menor frequência contribuindo para a elevação da pressão arterial.

2.1.3.7. Reflexos quimiorreceptores.

Os reflexos dos quimiorreceptores são mediados centralmente por receptores no tronco cerebral e por receptores periféricos nos corpos aórticos e carotídeos. Os quimiorreceptores respondem a parâmetros que reflectem hipoxia, hipercapnia, acidemia e isquemia. Os reflexos dos quimiorreceptores são principalmente dirigidos ao controlo respiratório mas também exercem influência sobre parâmetros cardiovasculares. As vias aferentes destes arcos reflexos serão encaminhadas através do nervo vago e glosso-faríngeo.

2.1.3.7.1 Reflexo quimiorreceptor periférico.

Aferentes dos corpos carotídeos e aórticos exercem convergência para o centro vasomotor. A resposta cardiovascular à estimulação quimiorreceptora consiste na vasoconstrição periférica e bradicardia. A hipoxia também produz hiperpneia e aumento da secreção das catecolaminas da medula adrenal, estas duas acções produzem taquicardia e aumento do volume de ejeção cardíaco. A hemorragia que produz hipotensão, estimula os quimiorreceptores. Esta estimulação deve-se à diminuição do fluxo sanguíneo nos quimiorreceptores e consequente anoxia por estagnação. A estimulação dos quimiorreceptores, também contribui para produzir as chamadas ondas de *Mayer* (Barrett et al., 2012). As ondas de *Mayer* são oscilações regulares lentas na pressão arterial que ocorrem à frequência de uma a cada 20-40 segundos durante a hipotensão. Nestas condições, a hipoxia estimula os quimiorreceptores. A estimulação eleva a pressão

arterial que por sua vez aumenta o fluxo sanguíneo para os órgãos e elimina o estímulo dos receptores. A pressão diminui e um novo ciclo é iniciado.

2.1.3.7.2. Reflexo quimiorreceptor central.

O centro vasomotor e outros receptores localizados no tronco cerebral respondem a alterações na pressão arterial de CO_2 (PaCO_2) e no pH. Os reflexos centrais predominam sobre os reflexos dos receptores periféricos estimulando o centro respiratório e causando um aumento na pressão arterial e uma diminuição na frequência cardíaca após um aumento na PaCO_2 ou diminuição do pH (Barrett et al., 2012). Os quimiorreceptores centrais são relativamente insensíveis à hipoxia. Os reflexos hipóxicos são mediados primariamente pelos quimiorreceptores periféricos (corpos aórticos e carotídeos) (Barrett et al., 2012). Concomitantemente, como resposta periférica directa à elevação da PaCO_2 ocorre vasodilatação o que anula os efeitos vasopressores centrais.

2.1.3.7.3. Reflexo quimiorreceptor de Cushing.

A hipoxia e a hipercapnia estimulam o centro vasomotor directamente. No entanto, o efeito directo da hipoxia é menor. Quando a pressão intracraniana aumenta, o fluxo sanguíneo para o centro vasomotor fica comprometido (Barrett et al., 2012). A hipoxia e a hipercapnia que se geram localmente aumentam a frequência de despolarização deste centro. O resultante aumento na pressão arterial causa uma diminuição reflexa na frequência cardíaca através dos baroreceptores arteriais.

2.1.3.7.4. Reflexo quimiorreceptor de Bezold-Jarisch.

Em resposta á isquemia registada nos quimiorreceptores das artérias coronárias, ocorre hipotensão e bradicardia. Paralelamente existe um aumento fluxo sanguíneo coronário (Barrett et al., 2012).

2.1.3.7.5. Sistema vasodilatador simpático.

As fibras simpáticas colinérgicas vasodilatadoras fazem parte do sistema regulador que se origina no córtex cerebral passa no tronco cerebral e passa igualmente sem

interrupção através da coluna intermédio-lateral através da espinal medula. Os neurónios pré-ganglionares activam os neurónios pós-ganglionares que inervam os vasos sanguíneos do músculo-esquelético. Estes neurónios apesar de anatomicamente pertencerem ao sistema simpático secretam acetilcolina. A estimulação deste sistema causa vasodilatação no músculo-esquelético. A secreção de adrenalina e noradrenalina é aumentada quando este sistema é estimulado reforçando a dilatação dos vasos do músculo-esquelético.

3. Biomecânica dos vasos e fluxo sanguíneo.

3.1. Biomecânica vascular.

Num sistema circulatório fechado como ocorre nos mamíferos, as grandes artérias tornam-se um componente importante da função cardíaca funcionando como reservatórios elásticos permitindo que o sistema arterial sofra grandes alterações no volume com pequenas alterações na pressão. Sem vasos elásticos, a ejeção de sangue que ocorre após a sístole elevaria demasiado a pressão. Por outro lado na diástole a pressão cairia tão rapidamente para níveis tão baixos que não permitiria o retorno de sangue ao coração. As grandes artérias elásticas são capazes de armazenarem uma porção do volume de ejeção em cada sístole para esvaziarem esse referido volume durante a diástole. Este fenómeno é conhecido como efeito de *windkessel* (Dobrin, 1978). Desta forma diminui-se a pós-carga no coração, minimiza-se o fluxo sistólico e maximiza-se o fluxo diastólico nas arteríolas. O resultado deste fenómeno é um fluxo distal mais constante durante o ciclo cardíaco. O que torna este fenómeno possível é umas paredes arteriais que contem uma matriz extracelular especializada com características que permitem uma reserva elástica. Os componentes da parede arterial dos vertebrados que contribuem para a maioria das propriedades mecânicas dos vasos são as fibras de colagénio e elastina depositas pelas células musculares lisas na túnica média. As fibras de elastina estão entrelaçadas numa rede tridimensional de lamelas desenhadas para transferir a tensão através da parede arterial. Entre estas lamelas de elastina localizam-se feixes de colagénio (principalmente colagénio tipo I e III) que não apresentam uma disposição definitiva em baixas pressões mas que apresentam um alinhamento circunferencial quando a pressão sobre a parede do vaso sobe (Wagenseil & Mecham, 2009). Estudos prévios indicam que menos de 10% das fibras são recrutadas a valores de pressão fisiológicos (Greenwald, et al., 1997). Enquanto que a altas pressões arteriais,

o vaso torna-se progressivamente menos distensível à medida que são recrutadas mais fibras de colagénio para suportar a tensão passiva na parede e restringir a distensão arterial. Com aumentos adicionais na tensão da parede, o diâmetro do vaso altera-se ligeiramente devido ao recrutamento adicional de feixes de colagénio confirmando a natureza não linear da elasticidade vascular. A parede das artérias actua como um material de duas fases com um módulo de elasticidade similar à elastina a baixas pressões e um módulo de elasticidade semelhante aos feixes de colagénio a tensões mais elevadas(Shadwick, 1999). Em todas as artérias de vertebrados e invertebrados existem artérias com um comportamento mecânico não linear(Shadwick, 1999).

3.2.Fluxo laminar e turbulento.

O sangue é um fluido viscoso e heterogéneo contendo na sua constituição células e solutos que geram uma tensão tangencial na parede do vaso. Esta força cria um atrito na superfície luminal dos vasos que pode danificar o endotélio. Se compararmos o fluxo sanguíneo de sangue com o fluxo de um fluido num tubo não ramificado constatamos que um fluxo laminar irá minimizar o dano potencial da tensão tangencial (Wagenseil & Mecham, 2009). O fluxo laminar ocorre quando há uma relação parabólica para a velocidade de fluxo no tubo. O centro do tubo tem uma maior taxa de fluxo e a área do fluxo próxima das paredes apresenta uma taxa de fluxo igual a zero. Neste modelo de fluxo laminar praticamente não existe mistura da solução de modo que nas paredes a velocidade do fluxo é próximo de 0 e não se irá produzir quase nenhuma tensão tangencial. Esse sistema também é muito eficiente sendo que muito pouca energia cinética é perdida como turbulência, no entanto um sistema não-ramificado para a irrigação dos tecidos é impraticável e não é compatível com a manutenção da vida. Por outro lado o fluxo turbulento perde grande parte da energia cinética produzida a partir do fluxo sanguíneo e pode gerar uma substancial tensão tangencial sobre as paredes dos vasos sanguíneos causando danos no epitélio. A energia perdida pela turbulência também pode produzir som. O som de fluxo turbulento por vezes pode ser ouvido a partir de vasos com paredes lesionadas causando estenose tal como ocorre na aterosclerose.

3.3. Dinâmica do fluxo e sua influência na hemocompatibilidade.

A dinâmica do fluxo afecta a deposição de fibrina e a consequente formação do trombo. O fluxo determina as taxas de transporte das células e proteínas para a superfície e também pode alterar o nível de expressão dos receptores nas plaquetas e leucócitos (Hanson & Sakariassen, 1998). Um fluxo com uma elevada tensão tangencial resulta em maior deposição de plaquetas e menor deposição de trombina. Por outro lado um fluxo com baixa tensão tangencial determina o inverso. Tal facto explica a diferença que ocorre na constituição dos trombos arteriais e venosos, sendo os primeiros formados por plaquetas e os segundos essencialmente por fibrina. No que concerne ao efeito do fluxo na activação da coagulação, o conhecimento actual centra-se na formação do factor Xa (FXa) pela via extrínseca e a formação de trombina pela via intrínseca. Foi estudado que a formação de FXa pelo complexo factor tecidual-factor VIIa aumenta em situações de tensão tangencial aumentada e taxas de fluxo mais elevadas (Gemmell, Nemerson, & Turitto, 1990). Por sua vez para a formação de trombina pela via intrínseca (por contacto com biomateriais) foram identificados três tipos de modelos (Basmadjian, Sefton, & Baldwin, 1997): em **baixo fluxo** há uma produção substancial de trombina após um tempo lag longo (10 horas); em **fluxos moderados** dá-se uma formação de trombina em quantidades significativas num curto período de tempo (em poucos minutos) e em fluxos elevados, em segundos são produzidos baixos níveis de trombina. O fluxo turbulento observado nas anastomoses, bifurcações e articulações dos diversos dispositivos cardiovasculares contribui para a os eventos trombóticos observados nestas localizações (Bluestein, Rambod, & Gharib, 2000). O fluxo turbulento resulta também em hemólise e activação das plaquetas mas os mecanismos que levam à formação dos trombos ainda são pouco conhecidos. As zonas de estagnação ou recirculação de sangue com ou sem características de fluxo turbulento devem ser evitadas na construção de próteses e noutros dispositivos por serem locais ideais para a formação de pequenos coágulos que crescem rapidamente obstruindo o lúmen das próteses vasculares (Bluestein et al., 2000). Quanto ao efeito do fluxo na adesão dos leucócitos aos dispositivos cardiovasculares, os resultados têm sido contraditórios. O fluxo elevado demonstrou que pode induzir uma redução, um aumento ou até deixar inalterado a adesão dos leucócitos a diferentes superfícies. Esta contradição de resultados deve-se às condições experimentais utilizadas nos ensaios de investigação, particularmente a presença de eritrócitos que desempenham um papel fundamental na adesão dos

leucócitos em condições de alto fluxo(Melder, Yuan, Munn, & Jain, 2000; Melder, et al., 1995).

3.4. Relação fluxo e hiperplasia da íntima

A hiperplasia da íntima e a formação de trombos são as principais complicações de longo e curto prazo respectivamente que levam numa primeira fase a estenose e posteriormente à oclusão do lúmen das próteses vasculares. No homem, a hiperplasia da íntima é um fenómeno que ocorre na região peri-anastomótica devido ao facto de proliferação da íntima poder ocorrer apenas na presença de tecido subendotelial (Zilla, Bezuidenhout, & Human, 2007). Nesta espécie, a grande maioria da superfície da prótese que contacta com o sangue permanece sem cobertura por qualquer tecido durante toda a sua vida útil por inexistência de uma cobertura endotelial. No entanto, a hiperplasia da íntima também ocorre quando são utilizados enxertos venosos autólogos estendendo-se nesta situação a todo o seu comprimento(Lemson, et al., 2000). A etiologia e a patogénese desta proliferação tecidular são consideradas multifactoriais desde o trauma cirúrgico à falta de endotélio, passando pela discordância na complacência entre prótese e artéria hospedeira até às condições de fluxo. Destas, a discordância de complacência e as variações no fluxo parecem ser as principais determinantes na redução ou aumento da espessura do tecido subendotelial. Histologicamente, a hiperplasia da íntima (Figura 2) é composta por 20 % de células musculares lisas que migraram da íntima perianastomótica (no caso específico das próteses vasculares), proliferaram e sintetizaram matriz extracelular que corresponde aos restantes 80% da íntima. Outros componentes da íntima hiperplásica incluem macrófagos e linfócitos podendo a sua superfície apresentar um endotélio dependendo da extensão da lesão e do tempo que passou desde a lesão inicial (Kraiss & Clowes, 1997).

A proliferação da íntima inicia-se em resposta a lesões do endotélio por alterações hemodinâmicas e segue uma sequência de eventos amplamente conhecida (Watase et al., 1992). Watase et al.(Watase et al., 1992), descreveram seis fases da proliferação da íntima em artérias lesionadas:

- 1- Formação inicial de trombo
- 2- Fagocitose do trombo
- 3- Surgem fibroblastos e inicia-se a sua proliferação na íntima
- 4- Aparecem células endoteliais que proliferam

- 5- Surgem células musculares lisas
- 6- Dá-se a hiperplasia da íntima por proliferação de fibroblastos e respectiva produção de feixes de colagénio.

No entanto, em contraste com a hiperplasia da íntima em artérias, este fenómeno nas próteses vasculares ocorre profundamente ao endotélio (Clowes, Gown, Hanson, & Reidy, 1985). Esta observação suporta o facto de que as células endoteliais secretam factores de crescimento que interferem na patogénese (Figura 3). Contudo, as próteses vasculares também podem induzir as células musculares lisas a produzir factores de crescimento de várias formas (Ombrellaro, et al., 1996). Esta síntese pode ser estimulada de diversas formas nomeadamente: i) a síntese de factores de crescimento por macrófagos envolvidos na reacção de corpo estranho (Xia & Triffitt, 2006); ii) a ausência de revestimento endotelial na superfície das próteses activa plaquetas que por sua vez libertam factores de crescimento (Ombrellaro et al., 1996); iii) a discordância de complacência (Figura 3) nas anastomoses pode levar a uma excessiva distensão nas células musculares lisas que estimula a sua proliferação; iiiii) o fluxo turbulento decorrente da discordância de complacência causa lesão das células endoteliais que libertam factores de crescimento (Kraiss & Clowes, 1997); iiiiii) zonas de fluxo com baixa tensão tangencial e separação de fluxos são observadas próximo das anastomoses o que facilita a adesão e activação plaquetária libertando factores de crescimento (Ombrellaro et al., 1996).

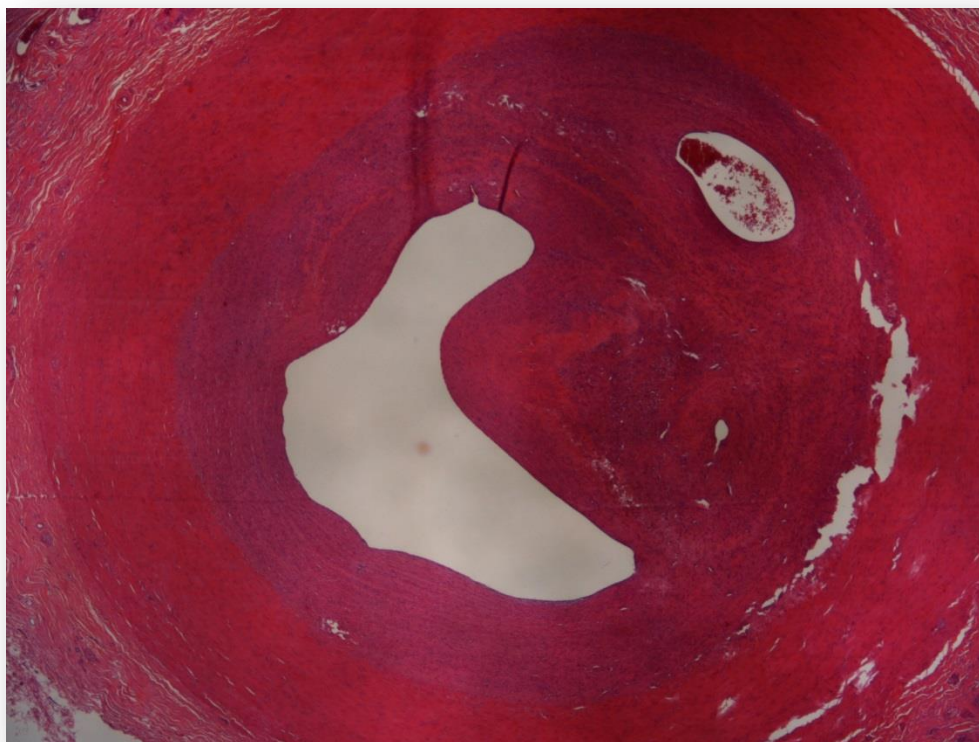


Figura 2 – Corte transversal da artéria carótida comum externa ao nível da transição com a prótese vascular sintética exibindo hiperplasia da íntima (20x, hematoxilina&eosina)

As alterações na hemodinâmica desempenham um papel fundamental na patogenia da hiperplasia da íntima. Quando o fluxo sanguíneo ocorre no segmento vascular, este exerce uma tensão tangencial na superfície luminal das células endoteliais (Lemson et al., 2000). A tensão tangencial é o produto taxa tangencial na parede, ou seja é a derivada radial da velocidade do fluxo junto à parede do vaso e da viscosidade local do sangue. A tensão tangencial pode ser calculada pela lei de *Poiseuille* (Equação 1) onde η é igual a viscosidade, Q é igual a velocidade do fluxo e r é igual ao raio interno do vaso.

Equação 1 - Lei de Poiseuille

$$\tau = \frac{4\eta Q}{\pi r^3}$$

A tensão tangencial na parede do vaso demonstrou ser um importante determinante na libertação de compostos vasoactivos e factores de crescimento pelas células endoteliais que estimulam moléculas de adesão como as integrinas e o espessamento da íntima e média da parede vascular(Hecker, et al., 1993). Pela equação 1, é possível afirmar que a tensão tangencial está relacionada com o fluxo e inversamente relacionada com o diâmetro. Para existir um aumento ou diminuição da tensão tangencial na parede de um vaso ou prótese, esta relação dependerá do aumento proporcional do diâmetro e fluxo(Busse & Fleming, 1998). No entanto, o diâmetro do vaso influenciará em maior proporção a tensão tangencial e quando um vaso aumenta de diâmetro a tensão tangencial obrigatoriamente diminuirá. Assim um vaso normal responde a uma diminuição da tensão tangencial por diminuição do fluxo com vasoconstrição. Existem duas correntes de opiniões suportadas por diversos estudos que relacionam o fluxo e a tensão tangencial com a hiperplasia da íntima. Assim temos que **um baixo fluxo e uma baixa tensão tangencial** conduzem a hiperplasia da íntima (HI) e por outro lado **as condições de alto fluxo e elevada tensão tangencial** conduzem igualmente a HI.

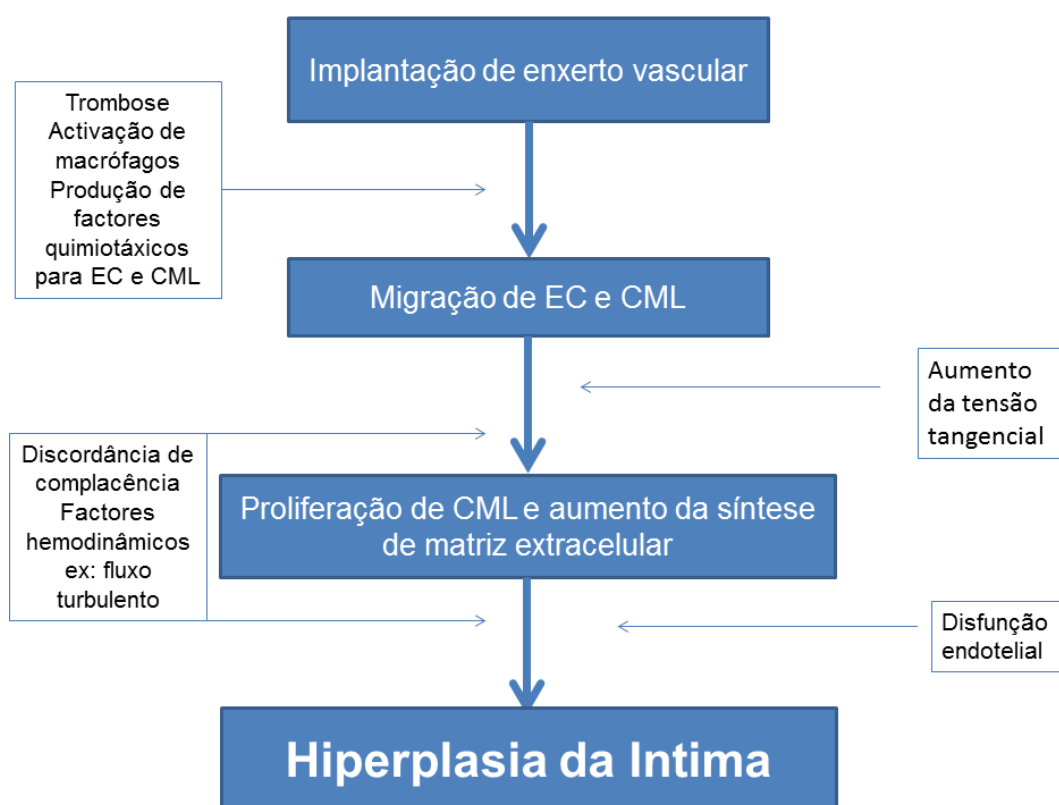


Figura 3 – Esquema dos eventos fisiopatológicos que conduzem a hiperplasia da íntima (Adaptado de Lemson et al., 2000). EC- células endoteliais, CML-células musculares lisas.

Em fístulas arteriovenosas criadas experimentalmente em cães entre a artéria femoral e a veia femoral através de próteses de ePTFE, a espessura da íntima-média era 50% inferior no local de fluxo normal quando comparado com o local de alto fluxo e alta tensão tangencial (Fillinger et al., 1989). Mais recentemente, igualmente num cenário experimental revelou que a redução no fluxo e na tensão tangencial pode reduzir a hiperplasia da íntima em artérias cronicamente expostas a condições de elevado fluxo e tensão tangencial (Nanjo et al., 2006). Em humanos, comprovou-se que nos locais de fluxo mais elevado das fístulas arteriovenosas confirmado através da medição da velocidade no pico da sístole, desenvolveu-se a íntima mais espessa (Hofstra et al., 1995).

Nas próteses vasculares verificou-se também que a HI ocorre particularmente na linha de sutura sendo que tal facto pode ter uma componente resultante da cicatrização e adicionalmente uma componente derivada da discordância da complacência que ocorre entre prótese e vaso (Bassiouny et al., 1992b). A forma como o modelo de elevado fluxo e elevada tensão tangencial se traduz biologicamente na formação de uma íntima mais

espessa está relacionado com o dano mecânico na parede do vaso. A elevada tensão tangencial causa estiramento das células musculares lisas induzindo à sua proliferação (Lemson et al., 2000). Adicionalmente, este dano físico causa igualmente dano endotelial induzindo adesão e activação plaquetária com libertação de factores de crescimento (ex: factor de crescimento derivado das plaquetas e TGF- β), potenciando a proliferação das células e a degradação da matriz extracelular, o que facilita ainda a migração de mais células musculares lisas. O processo de migração das células musculares lisas relaciona-se com o aumento da síntese de ECM, tendo em conta que estas células também sintetizam ECM em resposta aos factores de crescimento que induzem a sua própria proliferação. A contribuição proporcional de cada um destes componentes para a HI mantém-se constante excepto imediatamente abaixo do epitélio onde as células musculares lisas são mais abundantes (Lemson et al., 2000).

Em oposição, o modelo de baixo fluxo e baixa tensão tangencial poderá levar a HI. Vários estudos colocaram em evidência o papel do baixo fluxo na origem da HI utilizando fístulas arteriovenosas, demonstrado que as áreas onde o fluxo era menor por constrição externa resultaram em íntimas mais espessas (Dobrin, Littooy, & Endean, 1989; Dobrin, Littooy, Golan, Blakeman, & Fareed, 1988). No entanto, pensa-se que nestes estudos o factor que esteve na génese da hiperplasia da íntima foi a tensão tangencial na parede e não o fluxo em si.

O **tipo de anastomose** é outro factor a considerar no desenvolvimento de HI. As anastomoses topo-lado desenvolvem mais HI do que as anastomoses topo-a-topo (Sotturrai, 1999). Diversos estudos têm atribuído este fenómeno ao fluxo turbulento oscilatório e às oscilações de tensão tangencial (Shigematsu, et al., 2000). Estes **distúrbios do fluxo** podem ser responsáveis pelo levantamento do endotélio, expondo-o a plaquetas e iniciando-se a partir daqui o processo fisiopatológico exposto anteriormente e que conduz à migração e proliferação de células musculares lisas. A **discordância entre o diâmetro** da prótese e a artéria nativa é outro aspecto a considerar na formação de HI. Apesar de existirem alguns estudos com resultados contraditórios é hoje mais consensual que a discordância do diâmetro causa distúrbios no fluxo que levam a HI (Sunamura, Ishibashi, & Karino, 2007). A discordância no diâmetro na região da anastomose causa uma dissipação na energia que levará a uma tensão física na parede arterial adjacente. Esta tensão será cíclica e sincronizada com o batimento cardíaco induzindo a proliferação de células musculares lisas. Modelos matemáticos determinaram que o ratio ideal de diâmetros entre a prótese e vaso nativo será de 1,6-2/1 (Lei, Archie, &

Kleinstreuer, 1997). Em situações de extremos opostos, ou seja quando a prótese apresenta um diâmetro muito superior ao vaso nativo ocorre turbulência por diminuição de fluxo com recirculação (Sunamura et al., 2007). Se acontecer o inverso, ocorre uma aceleração do fluxo na extremidade distal da anastomose com aumento da tensão tangencial na parede do vaso. Em ambas as situações, para além da tensão tangencial absoluta sobre a parede do vaso o que tem sido destacado como factor essencial para a formação da HI é o gradiente de tensão tangencial que existe na região da anastomose (Lei et al., 1997).

Na situação das anastomoses término-laterais, o **ângulo de anastomose** na extremidade distal é um factor a considerar na formação da HI devido à sua relação com a turbulência do fluxo. Através de modelos matemáticos ou de visualização de fluxo foi considerado que o ângulo de 20° é aquele que produz menos alterações no fluxo e menor variação no gradiente de tensão tangencial (Lei et al., 1997; Henry, et al., 1996)

Classicamente, um factor que é considerado com influência na formação de HI é a discordância de complacência. O ratio de complacência entre as próteses e os segmentos de vasos nativos é um indicador do potencial de fluxo turbulento que poderá ocorrer na zona de anastomose (Miyawaki, How, & Annis, 1990). Para o fluxo pulsátil que se observa nas artérias considera-se que um valor inferior a 0,19 é indicativo de fluxo turbulento. Os padrões de fluxo perianastomóticos são assim afectados pela rigidez da prótese. Nas próteses menos complacentes ocorre um fluxo reverso com formação de um vórtex (Wang, et al., 1990). Experimentalmente, a complacência foi reduzida artificialmente por incorporação na parede de um enxerto venoso de uma rede de *Dacron* ou *Phynox* o que resultou num aumento de HI (Trubel et al., 1995). Em cães, foi comparada a formação de HI entre próteses vasculares de ePTFE e enxertos venosos de veia safena para procedimentos de *bypass* entre as artérias ilíaca e femoral demonstrando-se a formação de uma íntima mais espessa nas amostras das próteses de ePTFE (Bassiouny et al., 1992a). As diferenças causam alterações no fluxo decorrentes da discordância de complacência causarão danos no epitélio a partir do qual se iniciam as etapas que conduzem a HI (Weston, Rhee, & Tarbell, 1996). Adicionalmente foi verificado que a HI ocorre com maior espessura na anastomose caudal (Weston et al., 1996).

4. Angiogénese e vasculogénese

Os vasos sanguíneos originam-se através de dois processos: **a angiogénese**, em que se formam capilares a partir de vasos pré-existentes e **a vasculogénese** que consiste na formação de capilares que tem origem em células endoteliais (EC) indiferenciadas ou células progenitoras endoteliais (Nomi, et al., 2002). A formação dos primeiros capilares tem lugar durante as primeiras fases da embriogénese (Folkman, 1997). Os plexos vasculares do saco vitelino originam-se da mesoderme por diferenciação dos angioblastos, que subsequentemente originam vasos sanguíneos primitivos (Risau, 1997). A **angiogénese** é um processo morfogénico em que novos capilares se originam a partir de vasos pré-existentes. Estão descritos seis passos na angiogénese (Nomi et al., 2002): i) vasodilatação do vaso progenitor, reduzindo o contacto entre as (EC), ii) degradação da membrana basal do vaso progenitor por enzimas proteolíticas, iii) migração e proliferação de EC para formar um neoendotélio no novo capilar, iiiii) formação de um lúmen capilar e respectiva estrutura tubular, iiiiii) síntese da membrana basal, iiiiii) recrutamento de perócitos e células musculares lisas. A angiogénese desempenha um papel importante na cicatrização de feridas, formação de vasos colaterais e nas variações cíclicas da estrutura do tecido do sistema reprodutor feminino (Nomi et al., 2002). No coração, a formação de vasos colaterais a partir de capilares pré-existentes é um processo importante para proteger o órgão de danos isquémicos (Witzenbichler et al., 1998). Para além de importante em processos fisiológicos, a angiogénese é fundamental em situações patológicas nomeadamente no crescimento tumoral e na formação de metástases (Folkman & Hanahan, 1991).

O processo de **vasculogénese** pode ser dividido em 5 passos fundamentais (Drake, 2003; Nomi et al., 2002): i) EC são originadas de células precursoras designadas de angioblastos, ii) EC formam o vaso primordial e agregam-se para estabelecer um contacto célula a célula, iii) formação de uma estrutura tubular composto de EC, iiiii) formação de uma rede vascular composta de tubos endoteliais em formação, iiiiii) o recrutamento de perócitos e células musculares lisas. As EC encontram-se em circulação no sangue periférico de indivíduos adultos. Estas EC originam-se por sua vez nas células endoteliais progenitoras da medula óssea e são mobilizadas para a circulação (Asahara & Kawamoto, 2004). Subsequentemente, as células progenitoras endoteliais são mobilizadas para a corrente sanguínea onde participam no processo angiogénico. Esta evidência sugere que a neovascularização pós-natal não reside exclusivamente na angiogénese e que a vascularização tecidual pode ser auxiliada pelas células

progenitoras endoteliais através de um processo de vasculogénese pós-nascimento(Asahara et al., 1997; Asahara & Kawamoto, 2004).

No individuo adulto, as EC dos grandes vasos encontram-se no estado quiescente devido a inibição celular por contacto. Quando estimuladas para a fase angiogénica, as EC adquirem propriedades que facilitam a neovascularização tecidual(Folkman & Hanahan, 1991). A conversão do estado quiescente para o estado angiogénico pode ser estimulada por diversas condições tais como hipoxia. Ao alterar o seu fenótipo para o estado angiogénico aumenta-se a sua sensibilidade para factores angiogénicos por modulação da expressão de receptores. Quando expostas aos factores angiogénicos, as EC sofrem um processo de desenvolvimento que passa pela formação de tubos endoteliais que se ramificam e finalmente formam uma rede vascular (Asahara, et al., 1995; Kalka, et al., 1999). Entre os principais factores angiogénicos destacam-se **o factor de crescimento vascular endotelial, o factor de crescimento dos fibroblastos e o factor de crescimento dos hepatócitos**. Estes factores exercem a sua acção directamente nas EC por acção em receptores superficiais que existem nas membranas celulares. Todos estes factores são mitogenos potentes que exercem a sua acção em processos fisiológicos e patológicos. Adicionalmente, existe um grande grupo de compostos que não induzem a proliferação ou migração de EC *in vitro* mas que induzem angiogénese *in vivo*. Estes factores são considerados factores angiogénicos indirectos e incluem **o factor de crescimento derivado das plaquetas, a angiopoietina e o factor de crescimento transformador beta(Nomi et al., 2002)**.

5. Interacção dos mecanismos de coagulação com biomateriais e dispositivos cardiovasculares.

A hemocompatibilidade dos dispositivos e mais especificamente dos biomateriais que contactam com o sangue relaciona-se directamente com a resposta trombótica induzida pelos biomateriais e é vital para o seu desempenho funcional. As manifestações clínicas ou funcionais de bioincompatibilidade de dispositivos cardiovasculares são numerosas desde: i) obstrução de completa de *stents* semanas após a sua colocação(Bittl, 1996); ii) oclusão aguda ou sub-aguda de próteses vasculares de baixo a médio calibre (4-6 mm de diâmetro interno)(Hoffman et al., 1987); iii) complicações embólicas de válvulas cardíacas(Edmunds, Jr., 1996; Edmunds, Jr., 2001) e cateteres venosos centrais

(Eberhart & Clagett, 1991). As próteses vasculares de maior calibre ($> 8\text{mm}$) mantêm-se trombogénicas durante muitos anos. No entanto, nas próteses deste calibre as complicações trombóticas são menos frequentes devido ao inerente fluxo elevado que dilui os factores de coagulação. Além de que este tipo de próteses mantêm-se patentes durante períodos mais longos porque a oclusão apesar de ser possível é mais lenta devido ao maior diâmetro interno (ID). Nas próteses vasculares de baixo diâmetro (PVDB) pode ocorrer uma obstrução aguda apesar do uso de protocolos terapêuticos profilácticos com anticoagulantes (Gorbet & Sefton, 2004a). Esta complicação apresenta uma elevada prevalência e até ao presente apesar de intensa pesquisa ainda não foi produzido um biomaterial com um perfil de hemocompatibilidade adequado para o fabrico de PVDB. Daí que o objectivo principal deste trabalho seja a produção de uma prótese vascular de baixo diâmetro utilizando uma combinação de polivinil álcool hidrogel com dextrano.

5.1. Interações sangue-biomaterial.

Em condições fisiológicas, o sangue contacta com o endotélio que apresenta propriedades anticoagulantes e antitrombóticas. O uso de próteses vasculares representa a introdução de uma superfície estranha na circulação que interacciona com o sangue desencadeando uma série complexa de eventos que inclui entre outros: a adsorção de proteínas plasmáticas, a adesão activação de plaquetas e leucócitos e a activação da cascata de coagulação e do complemento.

A adsorção de proteínas é o primeiro evento a ocorrer quando o biomaterial entra em contacto com o sangue. Esta adesão e acumulação no interface sangue-biomaterial ocorre dentro de segundos, [29]. As chamadas proteínas de fase de contacto do plasma envolvidas na adsorção inicial são a albumina, imunoglobulinas, fibrinogénio, a fibronectina, o FXII e o CMA(Hanson & Tucker, 2013). Esta camada pode induzir a coagulação, a activação e adesão celular, a activação do complemento, e ao induzir a conversão de fibrinogénio em fibrina, induz também a resposta fibrinolítica. As proteínas que aderem em primeiro lugar às superfícies (albumina, globulinas e fibrinogénio) são substituídas ao longo do tempo (efeito de Vroman) por CPMA, FXII e precalicreína. No que concerne à interacção do biomaterial com a cascata de coagulação, o factor XII (FXII) será o primeiro a ser activado na presença de uma prótese vascular(Zhuo, et al., 2005). Classicamente, o FXII é activado por adsorção ou contacto com uma superfície que apresenta uma carga negativa em FXIIa. FXIIa converte a précalicreína

em calicreína que com o cininogénio de alto peso molecular (CAPM) como cofactor activa o factor XI (Zhuo et al., 2005). Iniciando-se a partir deste último factor a restante activação da via intrínseca. No entanto devido à falta de relevância do FXII para activação da via intrínseca em condições fisiológicas, pensa-se que o cininogénio de alto peso molecular (CAPM) desempenhará o principal papel de activação da via intrínseca da coagulação no que concerne às interacções sangue-biomateriais (Zhuo et al., 2005; Horbett, 1993). O FXII tem sido observado em quantidades moderadas na superfície de biomateriais usados em próteses vasculares (Ziats, Pankowsky, Tierney, Ratnoff, & Anderson, 1990) e em membranas de hemodiálise (Mulzer & Brash, 1989) embora não tenha sido detectado na forma activada (Cornelius & Brash, 1993). Outra evidência que sugere a irrelevância do FXII na activação da coagulação é a inexistência de uma correlação entre altos níveis de FXII e calicreína na superfície de biomateriais e formação de complexos trombina-antitrombina (TAT) (Chen, Yuan, Song, Wu, & Li, 2008; van der Kamp, Hauch, Feijen, & Horbett, 1995). Recentemente, a investigação na interacção entre sangue e biomateriais tem mudado o seu foco de pesquisa para a activação da via extrínseca da coagulação. Hong et al sugere que a interacção dos biomateriais com os leucócitos induziria a expressão de factor tecidual (FT) e desta forma representaria o principal estímulo na activação da coagulação. A célula, nomeadamente o monócito tem sido o principal implicado na expressão FT por leucócitos quando o sangue contacta com o biomaterial (Hong, Nilsson, Reynolds, Larsson, & Nilsson, 1999). Este facto foi demonstrado *in vivo* na expressão de FT por monócitos em pacientes sujeitos a *bypass* cardiopulmonar, tendo sido doseado o FT antes e depois deste procedimento. Outra via de aumento de expressão ou libertação de FT será aquando da realização de procedimentos de cirurgia vascular, nomeadamente quando se coloca uma prótese vascular para a realização de *bypass* vasculares ou fístula arteriovenosa em que ocorre dano do endotélio e libertando-se FT, colagénio e Factor de *von Willebrand* (FvW) (de Mel, Cousins, & Seifalian, 2012). A formação TAT em polivinil cloreto (PVC) foi dada como negligenciável quando este biomaterial contacta com plasma ou plasma rico em plaquetas (PRP), por outro lado quando o mesmo biomaterial contacta com sangue total os níveis de TAT sobem significativamente sugerindo que a presença de leucócitos é o factor diferenciador na subida de TAT.

O sistema de complemento consiste em mais de 20 proteínas que funcionam como enzimas ou proteínas de ligação. A activação do complemento é iniciada através da via clássica ou alternativa existindo igualmente uma via terminal que é comum às duas vias

anteriores. Ambas as vias contêm uma enzima inicial que catalisa a formação de C3 convertase que por sua vez gera C5 convertase permitindo a formação do complexo terminal completo. A activação do complemento liberta C3a, C4a e C5a, péptidos que se ligam a receptores de neutrófilos, monócitos, mastócitos e células musculares lisas. Estes péptidos induzem uma variedade de respostas celulares nas quais se incluem a activação e adesão celular. Na presença de um biomaterial é convencionalmente definido que o complemento é activado pela via alternativa. As superfícies dos biomateriais são usualmente classificadas em dois grupos, superfícies activadoras ou não-activadoras do complemento (Gorbet & Sefton, 2004b). Nas superfícies ditas activadoras ocorrem geralmente os grupos amina e hidroxilo, estes grupos promovem a formação de C3 e C5 convertase (Bittl, 1996). Entre as superfícies não activadoras encontram-se aquelas que apresentam grupos com carga negativa como os carboxilos, os sulfatos, o ácido siálico e a heparina que aparentemente promovem uma elevada afinidade de associação entre C3b e o factor H, inactivando-se o efeito amplificador de C3b na activação do complemento (Bittl, 1996).

A activação e adesão de plaquetas é uma das componentes da interacção do sangue com os biomateriais dos dispositivos cardiovasculares. As plaquetas através da interacção com a fibrina formam o trombo, que é um evento de bioincompatibilidade a evitar em dispositivos médicos que contactam com o sangue. A activação e adesão plaquetária foram descritas em membranas de hemodiálise, próteses vasculares, cateteres venosos e nos aparelhos de *bypass* cardiopulmonar (Hanson & Tucker, 2013; Heijnen, et al., 1999). A trombogenicidade destes dispositivos está estreitamente relacionada com a capacidade dos biomateriais em activarem as plaquetas. Existem vários tipos de interacção das plaquetas com os biomateriais. A activação de plaquetas sem adesão conduz a um elevado consumo com formação de microtrombos. Têm sido descritas diversas situações em que a activação de plaquetas manifestada pela formação de micropartículas plaquetárias (MPP), não se concretizou em adesão plaquetária. Este facto verificou-se com o polivinil álcool hidrogel *in vitro* (Godo & Sefton, 1999) e *ex vivo* (Gemmell, Yeo, & Sefton, 1997). Estes estudos verificaram que após a activação das plaquetas não aderentes ocorre a sua remoção da circulação e aumento do seu consumo. Após o contacto com a camada de proteínas adsorvidas na superfície do biomaterial pode ocorrer adesão ou arrastamento pelo fluxo sanguíneo. O tipo de interacção depende do estado de activação e os receptores presentes no interface do biomaterial. Nesta situação é necessário a interacção entre o fibrinogénio e a expressão

do respectivo receptor GPIIb/IIIa (CD41/CD61) e/ou a adesão entre o receptor GPIIb/IIIa e FvW (Bailly et al., 1996; Sheppard, McClung, & Feuerstein, 1994; Hanson & Tucker, 2013; Grunkemeier, et al., 2000).

A expressão da *P*-selectina, uma glicoproteína de superfície que pertence à família das selectinas e desempenha um papel importante na mediação da adesão de plaquetas activadas a neutrófilos, monócitos e a linfócitos (Gorbet & Sefton, 2001). Esta associação ocorre na presença de próteses vasculares e outros dispositivos e tem sido utilizada como parâmetro para quantificar a hemocompatibilidade (Sinn, Scheuermann, Deichelbohrer, Ziemer, & Wendel, 2011). Possivelmente, esta associação pode contribuir para a formação de trombina através da expressão do FT pelos monócitos quando em contacto com as plaquetas (Gorbet & Sefton, 2001; Gorbet & Sefton, 2004a). A interacção das plaquetas com os leucócitos através da *P*-selectina pode auxiliar à remoção das plaquetas activadas da circulação.

Os outros mecanismos de interacção nomeadamente a activação da coagulação através da geração de trombina levarão também à activação das plaquetas. Outro agonista das plaquetas, o ADP é também libertado pelos eritrócitos e/ou plaquetas fragmentados (Gorbet & Sefton, 2004a). A activação do sistema de complemento pode também levar à activação das plaquetas, especificamente através do receptor plaquetário para C1q que demonstrou a capacidade de induzir a expressão de: GPIIb/IIIa, a *P*-selectina e a actividade procoagulante das plaquetas (Peerschke & Ghebrehiwet, 1998).

5.2. Estratégias de melhoria da biocompatibilidade dos biomateriais.

A modificação das superfícies dos biomateriais com o objectivo de melhorar a biocompatibilidade das próteses vasculares segue duas abordagens. A primeira estratégia segue o fabrico de uma prótese vascular com características físicas compatíveis que permitam a existência de uma superfície inerte, antiaderente e antiagregante. A outra estratégia para a melhoria da biocompatibilidade passa pela biofuncionalização das superfícies que consiste na incorporação de moléculas bioactivas com o objectivo de desencadear respostas específicas que conduzem à biocompatibilidade. Todas estas estratégias têm como objectivo principal limitar eventos trombogénicos que reduzem a taxa de permeabilidade de próteses vasculares a curto e a longo prazo. Foi também esse o nosso objectivo quando copolimerizamos o polissacárido dextrano com efeitos sobre a activação da coagulação sobre a activação com o polímero PVA no fabrico de próteses vasculares.

5.3.Modificação físico-química.

A **topografia** das superfícies à escala do micron ou nanometro é uma importante propriedade física que influencia a adsorção de proteínas, a adesão plaquetária e a trombogenicidade(Lord, et al., 2011). A inclusão de poros e sulcos é um facto inevitável no fabrico de próteses vasculares especialmente na superfície que contacta com o sangue. As proteínas de fase de contacto como o fibrinogénio, albumina e fibronectina aderem a nanoestruturas de forma mais eficiente e ligam-se aos receptores plaquetários mais facilmente do que em superfícies planas(Yaseen, et al., 2010). A **porosidade** é outro factor crucial na topografia das superfícies das próteses vasculares. Um estudo recente revelou que as EC proliferam melhor em superfícies com poros de menor diâmetro (5-10 μm) e com menor espaço entre poros(Ahmed, et al., 2011).

Com o objectivo de tornar as superfícies das próteses não incrustantes para prevenir a adsorção de proteínas e adesão a plaquetária. Grande parte do esforço de investigação tem sido dirigido para a modificação química das superfícies combinando polímeros que causam a passivação dos materiais. Diversos polímeros têm sido utilizados como o dextrano que foi utilizado no presente trabalho experimental, o polietilenoglicol, óxido de polietileno limitando a formação de trombos e melhorando até a adesão de EC(Llanos & Sefton, 1993a; Llanos & Sefton, 1993b; Shen et al., 2002; Chen, et al., 2005). Estes mesmos polímeros podem também ser modificados para conter péptidos que facilitam selectivamente a adesão de EC. Recentemente, próteses de ePTFE foram revestidas com um elastómero biodegradável poli(1,8-octanediol citrato) demonstrando *in vitro* não só a redução de formação de trombos mas também uma maior adesão de EC em ensaios *in vivo* (Kibbe et al., 2010).O revestimento em carbono foi extensivamente estudado e é utilizado comercialmente em próteses de vasculares de PET e ePTFE (Kakkos, et al., 2011; Akers, Du, & Kempczinski, 1993; Titushkin et al., 2001). Nestas próteses, foi demonstrado que a impregnação de carbono confere electronegatividade à superfície reduz a adsorção de proteínas e consequentemente dá-se também uma redução na adesão de plaquetas(Sbarbati et al., 1991). Estes resultados *in vitro* foram depois confirmados no contexto clínico através de uma taxa de permeabilidade superior quando comparados com as mesmas próteses mas sem revestimento de carbono(Kapfer, Meichelboeck, & Groegler, 2006; Sbarbati et al., 1991) .

5.4. Biofuncionalização de superfícies.

A biofuncionalização das superfícies das próteses vasculares tem seguido duas vias, nomeadamente a estimulação da endotelização dos dispositivos que contactam com o sangue e a produção de superfícies antitrombogénicas através da adsorção de moléculas com propriedades anticoagulantes e/ou antiplaquetárias. O endotélio é por excelência a superfície antitrombogénica e a endotelização de dispositivos cardiovasculares tem sido considerada a estratégia mais favorável para melhorar a função a longo prazo destes dispositivos. As primeiras tentativas de indução da endotelização *ex situ* em próteses vasculares num contexto clínico foram iniciadas por Meinhart *et al* (Meinhart *et al.*, 1997). Os resultados desta estratégia foram encorajadores conseguindo-se taxas de permeabilidade a longo prazo (8 anos) semelhantes a enxertos vasculares com veias autólogas (Meinhart *et al.*, 1997). No entanto, este procedimento não pode ser utilizado em situações de urgência porque é necessário realizar previamente a endotelização da prótese com células endoteliais autólogas em banho de tecidos. A endotelização *in situ* através do recrutamento de células endoteliais progenitoras (EPC) pelas próteses vasculares é um processo complexo que requer várias fases e incluem: i) a promoção da mobilização de EPC pela medula óssea, ii) estimular o alojamento de células específicas (EC, EPC e/ou células estaminais), iii) colocação de péptidos na prótese vascular que facilitam adesão celular, iv) modulação das células após adesão para formar rapidamente uma camada funcional de células endoteliais com capacidade para se autoreparar.

A mobilização de EPC pela medula óssea é a primeira etapa da endotelização das superfícies. As EPC derivam dos hemangioblastos que são igualmente as células precursoras das células de linhagem hematopoiética e são CD34 positivas (Rafii & Lyden, 2003). Ao contrário das células estaminais hematopoiéticas apresentam uma capacidade limitada multiplicação (Rafii & Lyden, 2003). Existem diversos estímulos que param ou estimulam a mobilização de EPC. A libertação de EPC pela medula óssea é mediada pelo óxido nítrico (NO) produzido pelos componentes reguladores do microambiente da medula óssea (osteoblastos e EC) na presença de factores mobilizadores como o factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o factor de crescimento placentário (Aicher *et al.*, 2003) (Leone *et al.*, 2009). Existem em circulação diversas substâncias que aumentam a disponibilidade de NO como a hormona de crescimento (GH), o factor de crescimento de insulina-1 (IGF-1), o VEGF e o factor de crescimento placentário que

consequentemente aumentarão os níveis de EPC circulantes(Li et al., 2006; Thum et al., 2007). Outros factores humorais implicados em outros processos fisiológicos como o factor estimulador das colónias de granulócitos (G-CSF), o factor estimulador das colónias de monócitos, o factor derivado do estroma (SDF-1 α) e a eritropoietina(Heeschen et al., 2003) (através da via de activação das cinases) demonstraram a capacidade de estimular a mobilização, proliferação e migração de EPC.

Em contraste, altos níveis de substâncias endógenas que limitam a disponibilidade de NO como dimetilarginina assimétrica (ADMA) estão associados e níveis mais baixos de EPC circulantes(Thum et al., 2005). A mobilização de EPC depende também de factores fisiológicos e patológicos. No que se refere a factores fisiológicos, verificou-se que o exercício mobiliza as EPC dos seus nichos da medula óssea através dos mecanismos mediados pelo NO e VEGF. Os estrogénios mobilizam as EPC actuando directamente nos receptores α e β , que tem influência nos mecanismos de NO e metaloproteinase 9 de libertação de EPC. Este facto pode ajudar a justificar a baixa prevalência de doenças cardiovasculares nas mulheres no período pré-menopausa quando comparada com os homens. Foi também verificado que a idade tem uma influência negativa no número de EPC circulantes. De facto, em indivíduos idosos ou de meia-idade as EPC circulam em menor número e apresentam uma função reduzida. Esta evidência potencialmente estará relacionada com a redução dos níveis de IGF-1 ao longo da idade. O mesmo pode acontecer com a redução dos mecanismos de regeneração vascular por EPC e com a redução das concentrações plasmáticas de VEGF o que pode limitar a mobilização de EPC na medula óssea. Em condições fisiopatológicas, o número de EPC circulantes pode estar aumentado ou diminuído em diversas afecções. A lesão vascular em diferentes modelos de isquémia do miocárdio e periférica demonstrou que consegue mobilizar com eficiência as EPC circulantes que se alojam no local da lesão onde se dividem, proliferam e aderem à íntima lesionada para promover o crescimento de um novo endotélio(He et al., 2004). A diabetes *mellitus*, a insuficiência renal crónica, a hipertensão arterial e a hipercolesterolemia entre outras afecções crónicas causam uma diminuição da EPC circulantes sendo provavelmente esta alteração a responsável pela deficiente regeneração vascular observada nestas patologias.

Com o objectivo de melhorar o alojamento da EPC, as próteses têm sido revestidas com moléculas que capturam as células EPC directamente da circulação após a implantação, mimetizando uma superfície potenciadora de alojamento. Estas células tem o potencial

de cobrir totalmente a superfície interna com um endotélio que mantém uma homeostasia ótima de coagulação minimizando a forma de trombos e o risco de estenose (Avci-Adali et al., 2013; Avci-Adali, Ziemer, & Wendel, 2010; Avci-Adali, et al., 2008). O recrutamento das células estaminais/EPC pelas próteses vasculares foi investigado através da adsorção de anticorpos monoclonais. As EC e EPC são positivos para o receptor CD34 e por essa razão anticorpos monoclonais CD34 podem ser ligados à superfície de próteses vasculares facilitando a adesão de EPC (Rotmans et al., 2005). Anticorpos monoclonais CD34 anti-humanos foram já adsorvidos a ePTFE em próteses vasculares. Experimentalmente foi tentado *in vitro* a adsorção de células endoteliais magnetizadas de suíno a próteses vasculares de Dacron previamente magnetizadas (Pislaru et al., 2006). As EPC de suíno foram colhidas do sangue periférico, separadas pelo gradiente de densidade de Ficoll e cultivadas durante 7-10 dias. Estas células foram posteriormente marcadas com microsferas de óxido de magnetizado e colocadas em contacto com as próteses. Apesar de neste estudo ter sido demonstrado que as forças magnéticas podem induzir rapidamente o revestimento das próteses por EPC magnetizadas na presença de fluxo sanguíneo; é uma metodologia que requer várias etapas realizadas em meio de cultura sendo por isso dispendiosa e demorada. Hoffman e colaboradores seguiram uma abordagem molecular ao produzir aptameros com uma alta afinidade para EPC de modo a conseguir endotelização mais rápida e eficaz (Hoffmann et al., 2008). Aptameros são oligonucleótidos de cadeia simples de ADN ou ARN com 70 a 80 nucleótidos de extensão que se podem ligar com alta afinidade e especificidade a um elevado número de moléculas como péptidos, proteínas, fármacos e até células (Nimjee, Rusconi, & Sullenger, 2005). Aplicando a tecnologia SELEX três aptameros de cadeia simples de ADN foram fabricados contra uma subpopulação de células de suíno positivas para a integrina CD31, tendo 72% destas células sido selectivamente ligadas por estes aptameros (Hristov, Erl, & Weber, 2003). Estes aptameros foram também testados *in vitro* ligando-os de forma covalente a discos de ePTFE e polidimetilsiloxano (PDMS) para avaliar a sua capacidade de se ligarem a EC/EPC em condições de fluxo (Hoffmann et al., 2006). Os referidos aptameros foram ligados às próteses através de um revestimento hemocompatível de polietilenoglicol (PEG) para garantir a ligação específica de EPC e para prevenir interacções bioincompatíveis entre o sangue e os polímeros (PTFE e PDMS). Este revestimento criou uma matriz antitrombogénica e desta forma aumentou a janela temporal para uma completa endotelização através da ligação de um número suficiente de EPC. Os resultados *in vitro* para o alojamento de EPC utilizando oligonucleótidos específicos para CD31 mostraram um maior número de EC aderentes. No

entanto, nos ensaios *in vivo* estes resultados não se confirmaram quanto à adesão de EC (Strahm et al., 2010)

A matriz extracelular (MEC) dos vasos nativos é constituída por proteínas fibrilares insolúveis (ex:colagénio) e glicoproteínas (ex:elastina, fibronectina, vitronectina e laminina), com diâmetro entre 5 e 500 nm que proporcionam um suporte mecânico e estrutural para as células. Com objectivo de simular a micro e a nanoestrutura da MEC dos vasos, diversos autores tem reportado a síntese da estrutura da matriz das próteses através de *electrospinning*, *self-assembly* e separação de fases. Esta estrutura tridimensional ao nível da nanotopografia facilita também a interacção das proteínas com as células e promove a sua adesão. Para otimizar a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular nos biomateriais é necessário uma superfície ou uma estrutura que mimetize a MEC nativa. Neste sentido, a mimetização da MEC facilitando a interacção com receptores celulares como integrinas com péptidos RGD (L-arginina, glicina e L-ácido aspártico) tem provado a sua eficácia no aumento da velocidade de endotelização(Alobaid et al., 2006; Alobaid, et al., 2005). Os RGD são péptidos derivados de domínios fundamentais das proteínas de MEC. As nanoestruturas facilitam também a interacção selectiva de determinadas proteínas que aderem espontaneamente aos polímeros. Algumas das proteínas como a vitronectina e a fibronectina aumentam as interacções das EC com os polímeros (Miller, Haberstroh, & Webster, 2007)

A modulação das EPC após adesão para formar rapidamente uma camada de células com um fenótipo endotelial é uma estratégia recente e resulta da incapacidade de todas EPC se transformarem em células endoteliais (Andukuri et al., 2013). Foi descoberto que existem dois tipos de EPC, as precoces e as tardias. As células formadoras de colónias endoteliais também designadas de EPC tardias são as únicas que possuem as características de EPC ou seja com capacidade para formar vasos sanguíneos *de novo* com uma camada endotelial funcional *in vivo* e/ou restaurarem a camada endotelial de um vaso danificado. A tensão tangencial gerada pelo fluxo sanguíneo nas paredes é um dos factores com a capacidade de estimular a diferenciação de EPC em um fenótipo endotelial maduro. Diversos estudos demonstraram que as EPC tardias respondem à tensão tangencial com um rearranjo do citoesqueleto no sentido do fluxo sanguíneo que servirá como um transductor das forças mecânicas em sinais bioquímicos para o núcleo(Cheng et al., 2013; Cui et al., 2012; Egorova et al., 2012). Tendo-se demonstrado que EPC tardias sujeitas a tensão superficial expressam em maior quantidade

marcadores de células endoteliais maduras como o CD31 e FvW(Cui et al., 2012). Para além do mais, o citoesqueleto está envolvido em vários aspectos da função celular como o movimento celular, a contracção e a diferenciação. Nesta diferenciação estarão também envolvidos factores de crescimento como o VEGF(Zeng et al., 2006). Na tentativa de estimular a diferenciação das EPC aderentes a biomateriais foram criadas matrizes biomiméticas que combinavam múltiplos componentes como péptidos anfifílicos que incluíam sequências de ligação para os receptores celulares, polímeros libertadores de NO e sequências biodegradáveis por enzimas para assegurar uma componente endotelial biomimética (Andukuri et al., 2013). Neste estudo foram cultivadas células humanas mononucleares colhidas no sangue periférico e cultivadas na referida matriz, tendo-se obtido após adesão destas células uma maior expressão de marcadores endoteliais (CD31, CD34, FvW e receptor VEGF do tipo 2) quando comparados com as superfícies controlo. Sugerindo que esta superfície consegue direccionar a diferenciação de EPC para um fenótipo endotelial tendo potencialmente um impacto positivo na taxa de permeabilidade de próteses e stents vasculares (Andukuri et al., 2013).

O fabrico de superfícies antitrombogénicas independentemente da presença de um endotélio é outra linha de investigação actual devido à dificuldade em se obter um revestimento completo e funcional dos diversos dispositivos cardiovasculares. Diversos autores têm posto em evidência a utilização de agentes anticoagulantes ou antiplaquetários adsorvidos na superfície ou através da sua impregnação na matriz da prótese. A libertação prolongada e continuada destes agentes terapêuticos através da sua diluição é outra forma de melhorar a biocompatibilidade. O objectivo final destas estratégias seria o aumento da taxa de permeabilidade a longo prazo através da redução da formação de trombos pela inactivação da trombina e/ou outros factores intervenientes da cascata de coagulação.

A heparina é o anticoagulante mais largamente utilizado na funcionalização de próteses vasculares(Ishii et al., 2008; Hoshi et al., 2013). Este anticoagulante liga-se à antitrombina III (ATIII) de forma irreversível através de uma sequência pentassacáridea causando uma alteração conformacional no centro reactivo de ATIII acelerando a taxa de inactivação de diversos factores da cascata de coagulação (trombina, FXIa, FXa, FIXa). Uma das limitações da heparina é que incapaz de inactivar a trombina quando esta se encontra ligada à fibrina ou às superfícies. A hirudina é um anticoagulante polipeptídico derivado da saliva da sanguessuga medicinal (*Hirudo medicinalis*) sendo o inibidor

conhecido mais potente da trombina. Apresenta as vantagens de conseguir inactivar a trombina ligada a superfícies e/ou fibrina e de actuar directamente sobre o sítio activo da trombina não necessitando de se ligar á ATIII. A hirudina foi testada em conjugação com microfibras de poli (L-acido láctico) através de um biomaterial intermediário, o polietileno glicol (PEG) em próteses vasculares de pequeno diâmetro (Hashi et al., 2010). Esta combinação demonstrou uma melhoria na taxa de permeabilidade através da inibição da trombina pela acção da hirudina ocorrendo também um efeito sinérgico com o PEG como inibidor da adesão/agregação plaquetária. Os inibidores pépticos do FXa, nos quais se incluem a antistatina e o péptido anticoagualante das carraças, reduzem a produção de trombina pela inibição de FXa que desempenha um papel central nas vias extrínseca e intrínseca da coagulação, sem interferir no nível basal de actividade necessária para a hemostase (Harker, Hanson, & Kelly, 1997). Entre outros péptidos anticoagulantes de interesse para uso em próteses vasculares inclui-se o D-Phe-Pro-Arg CH₂Cl (PPACK) que actua directamente na trombina inactivando o sítio activo da mesma (Rubens, Weitz, Brash, & Kinlough-Rathbone, 1993). O ximelagatran é também um inibidor oral directo da trombina que os ensaios clínicos demonstraram uma eficácia superior à warfarina (Corea, et al., 2006; Winkelmann, 2004). No entanto, ainda nunca foi incorporado nas paredes de próteses vasculares. Os inibidores dos receptores IIb/IIIa das plaquetas (ex:abciximab, eptifibatide, tirofiban) são usados clinicamente por via oral como antiagregantes plaquetários. Adicionalmente são também usados clinicamente em *stents* vasculares para prevenir reestenoses vasculares por trombos em doença coronária isquémica (Midwall et al., 2013; Le et al., 2014). Experimentalmente, estes fármacos foram já utilizados para dissolver agregados plaquetarios no lúmen arterial(Le et al., 2014).O clopidogrel e o cilostazol são antiagregantes plaquetários que actuam respectivamente como antagonistas dos receptores P2Y₁₂ e inibindo a fosfodiesterase III em plaquetas; tendo já sido utilizados experimentalmente em próteses vasculares de Dacron onde reduziram a formação de trombos (Inoue, et al., 2008), (Dorsam & Kunapuli, 2004).

O NO para além da acção do tónus vascular apresenta também propriedades antitrombogénicas por redução da adesão plaquetária (de Mel, Murad, & Seifalian, 2011). Com o objectivo de funcionalizar as próteses vasculares, o NO foi incorporado em polímeros sofrendo libertação prolongada ao longo do tempo. O NO actua sobre as plaquetas pela via do GMP cíclico (Irwin, Roberts, & Naseem, 2009) regulando a fosforilação e a nitrosilação das integrinas $\beta 3$, o que por sua vez interfere com as interacções das plaquetas com a MEC por reverter a actividade das integrinas(Roberts, et al., 2008) para um estado inactivo, diminuindo assim a sua adesão a superfícies. O

Factor XIII (FXIII) é o último factor da cascata de coagulação que estabiliza o rolhão plaquetário levando à formação de um coágulo estável (Catani, et al., 1998). Foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que o NO inibe o factor o FXIII por nitrosilação dos resíduos de cistina altamente reactivos (Catani et al., 1998). Aproveitando estas propriedades funcionais, foram desenvolvidos uma família de polímeros nanocompositos baseados em polycarbonatouretanos que foram funcionalizados com S-nitroso-N-acetilpenicilamina (Wang et al., 2002; Napoli & Ignarro, 2003). Estes foram ligados de forma covalente a nanopartículas de silsesquioxano oligomérico polihédrico que se autoagregam na superfície conferindo-lhe propriedades hidrofóbicas promovendo a retenção de NO e a sua libertação prolongada a partir da parede da próteses (Kannan, et al., 2005; Ghanbari, de, & Seifalian, 2011). Estas próteses demonstraram excelentes capacidades antitrombogénicas na sua superfície quando comparadas com as próteses comerciais de ePTFE (Sarkar et al., 2009; de Mel et al., 2011). As propriedades antitrombogénicas desta prótese foram também demonstradas *in vivo* em ensaios pré-clínicos num modelo animal (ovelha) através de uma elevada taxa de permeabilidade (de Mel et al., 2011).

6. Principais afecções do sistema vascular.

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade nos países desenvolvidos particularmente as que causam obstrução do fluxo (World Health Organization, 2012). Este grupo doenças inclui diversas afecções que necessitam de terapêutica cirúrgica através da realização de um procedimento de *bypass* utilizando um enxerto/prótese vascular artificial ou autólogo quando se recorre a uma veia ou artéria periférica do próprio paciente.

6.1. Doença arterial coronária.

A doença arterial coronária (DAC) é um problema de saúde pública no mundo desenvolvido sendo responsável por uma morte em cada 5 pacientes que morrem (Chilton, 2004). A aterosclerose é a principal causa de oclusão das artérias coronárias e a principal alteração patológica da DAC. Inicialmente a doença arterial coronária era considerada o resultado de uma deposição de lípidos que inevitavelmente conduziria a oclusão do vaso. Actualmente, existem evidências que na DAC as placas ateroscleróticas são uma manifestação de inflamação crónica em resposta a uma lesão ou infecção que

altera a função endotelial (Chilton, 2004). Desde sempre, os níveis elevados de colesterol, particularmente o colesterol transportado pela lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) em níveis elevados foram associados em estudos epidemiológicos como factor de risco para DAC. A redução dos níveis de LDL-C para níveis normais reduz o risco de DCA. Evidências sugerem que esta redução de lípidos poderá também reduzir a inflamação associada a formação das placas de ateroscleróticas. A formação das lesões iniciais de aterosclerose, designadas por estrias lipídicas (*fatty streaks*) ocorre por alteração da função endotelial através de infecção ou lesão (Chilton, 2004). As estrias lipídicas consistem em macrófagos e linfócitos incluídos numa camada fina de lípidos incluídos na parede arterial (Ross, 1999). Os macrófagos fagocitam os lípidos (*foam cells*) e tornando-se activos libertando moléculas quimiotáxicas, citocinas e factores de crescimento. Na sequência deste evento mais linfócitos são atraídos para a lesão produzindo mais moléculas efectoras, estimulando e perpetuando a resposta inflamatória. Este ciclo é continuado e desenvolve-se uma placa de ateroma com centro lipídico envolvida por uma matriz fibrosa que estabiliza a estrutura (Arroyo-Espliguero et al., 2004). Contudo, os possíveis eventos que iniciam a formação das estrias lipídicas ainda não são totalmente conhecidos, tendo-se no entanto atribuído a sua formação à deposição de LDL-C modificado pela oxidação, glicosilação, associação com proteoglicanos e complexos imunes, que ficam acumulados na parede arterial danificando o endotélio e musculo liso vascular (Khoo, et al, 1988; Khoo, Miller, et al., 1992; Steinberg, 1997; Navab et al., 1995; Berliner et al., 1997). Uma vez acumuladas as partículas de LDL-C tornam-se progressivamente mais oxidadas, formando-se peróxidos e facilitando a acumulação de esteres de colesterol (Ross, 1999). As partículas de LDL-C modificadas pela peroxidação são quimiotácticas para os monócitos circulantes e estimulam a proliferação dos macrófagos presentes na placa de aterosclerose. Os mediadores pró-inflamatórios presentes na lesão estimulam a ligação das partículas de LDL-C às células endoteliais e células musculares lisas que migraram para a lesão (Stoepck, Nicholson, Mancini, & Hajjar, 1993). À medida que a placa de ateroma vai ficando mais espessa o lúmen do vaso vai ficando progressivamente diminuído. Eventualmente, os macrófagos presentes na placa de ateroma libertam metaloproteinases que degradam a cápsula fibrosa colocando a placa vulnerável à rotura ou erosão (Xie, Nie, & Wang, 2009). A rotura da placa poderá levar a um enfarte agudo do miocárdio e a uma morte súbita. A rotura e erosão da placa torna-a vulnerável a um evento de trombose local, bloqueando de forma aguda a irrigação do miocárdio. Existem diversos achados patológicos que explicam a trombose focal nomeadamente uma

inflamação activa, uma cápsula fina, a lesão do epitélio que facilita a adesão e agregação das plaquetas na superfície na placa de ateroma e uma estenose da artéria superior a 90%(Chilton, 2004). As evidências da progressão das placas de aterosclerose sugerem que se trata de uma doença inflamatória crónica de baixo grau. A presença de linfócitos T e monócitos em todas as etapas de formação das placas de aterosclerose é compatível com uma inflamação activa. Adicionalmente, níveis elevados de proteína C – reactiva tem sido usado como marcador do processo inflamatório bem como uma ferramenta para estimar o risco de DAC e respectivas consequências(Naghavi et al., 2003a; Naghavi et al., 2003b).

6.2. Doença arterial carotídea.

Na origem da artéria carótida interna podem formar-se placas de aterosclerose levando a estenose. A estenose por placas de aterosclerose da carótida interna é responsável por grande parte dos acidentes vasculares cerebrais isquémicos (Adams, 2010) (Sobieszczyk & Beckman, 2006). Como já referido anteriormente, as placas de aterosclerose podem sofrer rotura levando à formação de um trombo intraluminal que pode soltar-se e causar uma embolia arterial. O trombo intraluminal pode *per si* causar a obstrução total da artéria carótida interna podendo potencialmente resultar na formação de um enfarte cerebral agudo. A fisiopatologia e os factores de risco da doença arterial carotídea são muito semelhantes a DAC(Adams, 2010). Os locais anatómicos de formação das placas de aterosclerose são também semelhantes, estando presentes nos locais de ramificação arterial e na zona de curvatura arterial(Rothwell, et al., 2000). O tratamento cirúrgico da estenose da artéria carótida classicamente tem consistindo na realização de endarterectomia, considerada a melhor opção para o tratamento cirúrgico com uma comprovada redução na mortalidade e morbilidade(Chambers, You, & Donnan, 2000). Contudo, a colocação de *stent* carotídeos tem emergido como uma alternativa não invasiva à endarterectomia em pacientes com comorbilidades e com maior risco anestésico(Yadav et al., 2004).

6.3. Doença arterial periférica.

As doenças arteriais periféricas (DAP) compreendem as doenças arteriais fora do coração e do cérebro (Abdulhannan, Russell, & Homer-Vanniasinkam, 2012). Ocorrendo principalmente nas artérias que irrigam os membros inferiores e em menor extensão nas

artérias que irrigam os membros superiores(Hills, et al., 2009). DAP é um termo usado para descrever o comprometimento do fluxo sanguíneo para as extremidades geralmente como resultado de doença oclusiva aterosclerótica. De um modo geral, a presença de sintomas na DAP depende das necessidades metabólicas do tecido isquémico durante o exercício, o grau de circulação colateral e do tamanho e localização da artéria afectada(Schirmang, et al., 2009). A incidência de DAP na população em geral de 3 a 10% em pessoas com idade inferior a 70 anos para 15-20% em pessoas com idade superior a 70 anos(Fowkes et al., 1991). No entanto, 40% dos pacientes com DAP são assintomáticos, enquanto apenas 10% deles apresentam com claudicação intermitente típica(Fowkes et al., 1991). Um terço dos pacientes afectados por DAP terá uma oclusão completa de uma artéria principal para a perna na primeira apresentação(Fowkes et al., 1991). A patofisiologia e os factores de risco da DAP resultam de qualquer doença que cause estenose ou oclusão das artérias do membro inferior sendo a doença aterosclerótica a etiologia mais comum de DAP(Selvin & Erlinger, 2004). Todo o processo de formação da aterosclerose segue as mesmas etapas descritas anteriormente para a DAC. Existe no entanto particularidades quanto à localização das oclusões na DAP, sendo as bifurcações arteriais o local preferencial devido ao efeito da perturbação do fluxo nos mecanismos de protecção do endotélio essenciais para a formação de placas ateroscleróticas. Para além da causa aterosclerótica existem múltiplas causas não relacionadas com a formação de placas ateroscleróticas mas que provocam igualmente oclusão da artéria. Diversos factores de risco foram implicados na DAP que incluem raça, idade avançada, sexo, tabagismo, hipertensão arterial, hipercolesterolémia, insuficiência renal crónica, condições inflamatórias sistémicas e tabagismo(Norgren et al., 2007). A escolha da terapêutica para a DAP depende essencialmente da apresentação clínica do paciente. A revascularização do segmento arterial obstruído está indicada em pacientes com isquemia aguda do membro ou claudicação intermitente. Paralelamente é realizada terapêutica com anticoagulantes e anti-agregantes plaquetários para reduzir o risco de doença cardiovascular relacionada com DAP sendo igualmente controladas as comorbilidades como a hipertensão e o diabetes *mellitus*(Norgren et al., 2007). Os procedimentos de revascularização dividem-se: em técnicas endovasculares que incluem a colocação de vários tipos de *stents* (ex:revestidos com PTFE ou com libertação prolongada de fármacos) em revascularizações supra-inguinais e infra-inguinais; e técnicas abertas que incluem a realização de um *bypass* em diversas localizações anatómicas nomeadamente aorto-femoral, femoro-femoral e femoro-poplitea (Abdulhannan et al., 2012). Para os procedimentos cirúrgicos de *bypass* estão

disponíveis vários tipos de próteses artificiais de ePTFE e *poliéster* (*Dacron*) bem como enxertos autólogos de veias e artérias periféricas. Sendo largamente aceite que os enxertos autólogos apresentam uma melhor taxa de permeabilidade a longo prazo e um melhor perfil de infecção quando comparados com as próteses sintéticas em *bypass* proximais e distais ao joelho (Klinkert, et al, 2004). Uma alternativa a estas técnicas referidas anteriormente, passa pela remoção directa da placa que obstrui a artéria através de dispositivos de aterectomia (*Mia* & *McKinsey*, 2008). Existem vários tipos destes dispositivos nomeadamente direccionais (*SilverHawk*), orbitais, rotacionais (*Rotablator*) e dispositivos de aterectomia por *laser* (*Excimer laser*). Não existindo no entanto estudos que comprovem a superioridade desta técnica em relação às anteriormente referidas

6.4. Aneurisma da aorta abdominal

Um aneurisma arterial é definido como uma dilatação focal de um vaso sanguíneo em relação ao diâmetro original da artéria (Aggarwal, et al., 2011). Um aneurisma aórtico abdominal (AAA) é definido como um diâmetro da aorta, de pelo menos, uma vez e meia o diâmetro normal ao nível das artérias renais, o que é aproximadamente 2,0 cm. Assim, em geral, um segmento de aorta abdominal com um diâmetro maior do que 3,0 cm é considerado um aneurisma da aorta (Ouriel et al., 1992; Hirsch et al., 2006). Aproximadamente 80% dos aneurismas da aorta ocorrem entre as artérias renais e a bifurcação aórtica. Os aneurismas da aorta constituem a décima causa de morte nos Estados Unidos da América (EUA) (Silverberg, Boring, & Squires, 1990). A cada ano nos Estados Unidos, a ruptura do AAA provoca 4500 mortes, as quais se juntam 1400 mortes adicionais resultantes de complicações dos 45000 procedimentos cirúrgicos realizados para evitar a ruptura (McPhee, Hill, & Eslami, 2007). O desenvolvimento do AAA está associado a diversos factores de risco: hipertensão; tabagismo; idade em que o risco de AAA aumenta dramaticamente após os 60 anos (Singh, et al., 2001) e o sexo, sendo que o risco de desenvolvimento de AAA é 4 a 6 vezes superior no homem quando comparado com a mulher (Lederle, Johnson, & Wilson, 2001). Existem outros factores predisponentes: os factores genéticos, uma história familiar de AAA aumenta o risco de desenvolvimento de aneurisma em quatro vezes (Salo, et al., 1999) e a presença concomitante de doença arterial aterosclerótica aumenta para o dobro o risco de desenvolvimento de AAA nestes pacientes (Cabellon S Jr, et al., 1983). A maioria dos AAAs são assintomáticos e são frequentemente diagnosticados como um achado

acidental em ultra-sonografia (USG), tomografia computadorizada (TC) abdominal ou ressonância magnética realizada para outros fins (Aggarwal et al., 2011). A maioria das AAAs é silenciosa, até que roturam, embora alguns sejam diagnosticados durante a avaliação de sintomas abdominais. Quando os aneurismas produzem sintomas, ocorre principalmente dor e sensibilidade à palpação, estando nestes casos em maior risco de ruptura. Os casos de aneurismas de pequena e média dimensão poderão ser tratados de forma medicamente (Isselbacher, 2005). As directrizes internacionais do *American College of Cardiology recomendam* a correcção cirúrgica de AAA com diâmetro igual ou superior a 5,5 cm em pacientes assintomáticos (Hirsch et al., 2006). Os pacientes com aneurismas sintomáticos e em que houve um aumento de diâmetro superior ou igual a 0,5 cm no diâmetro em seis meses deve também ser tratados cirurgicamente independentemente do diâmetro do aneurisma (Hirsch et al., 2006). As opções para terapêutica cirúrgica incluem a reparação cirúrgica aberta (incluindo a via transabdominal ou a via retroperitoneal) (Mitchell, et al., 1995) ou a abordagem endovascular, o qual envolve a inserção de uma endoprótese no lúmen, que exclui o aneurisma do fluxo sanguíneo, minimizando o risco de ruptura. Na abordagem aberta o segmento arterial é removido e substituído por uma prótese que é posteriormente fixada através de uma anastomose termino-terminal por sutura. As próteses podem ser tubulares no caso anastomoses término-terminais restritas à aorta ou bifurcadas quando se realiza uma anastomose entre a aorta e as artérias ilíacas (Mitchell, et al., 1995).

A reparação endovascular de aneurisma de aorta abdominal é uma alternativa menos invasiva e menos dispendiosa em relação à cirurgia aberta. A taxa de sucesso de curto prazo para a correcção de aneurisma pela técnica endovascular varia entre 83% e 95% (Greenhalgh, et al., 2004). As taxas de morbilidade e mortalidade a curto prazo da terapêutica cirúrgica endovascular apresenta, em muitos estudos melhores resultados do que a cirurgia abdominal aberta (Prinssen et al., 2004). Para os pacientes que apresentam um elevado risco para a cirurgia aberta, a taxa de mortalidade a curto prazo é significativamente menor com o tratamento endovascular (Teufelsbauer et al., 2002).

7. Enxertos vasculares.

Um enxerto vascular tem como finalidade substituir um segmento de um vaso ou contornar o seu fluxo através de um procedimento de *bypass* ou revascularização. Outra aplicação muito comum dos enxertos vasculares prende-se com a realização de fístulas

arteriovenosas em pacientes sujeitos a hemodiálise. A maioria dos enxertos são produzidas sinteticamente (próteses), mas os enxertos autólogos e alloenxertos são utilizadas frequentemente em aplicações clínicas (Teebken & Haverich, 2002). Os polímeros sintéticos ideais (Tabela 1) para esta aplicação devem apresentar propriedades químicas e mecânicas próximas do tecido nativo, assim como demonstrar resistência à biodegradação e trombose. Os materiais mais comumente utilizados incluem o polietileno de tereftalato (comercializado com a denominação DacronTM), o politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), e mais recentemente, de poliuretano (van Lith R & Ameer, 2011). O DacronTM e o ePTFE têm sido bem sucedidos em próteses vasculares de grande (ID > 10 mm) e médio (ID = 6-10 mm) diâmetro interno (ID) (Walpoth & Bowlin, 2005). No entanto, nas próteses de pequeno diâmetro (ID < 6 mm) fabricadas com os mesmos materiais falham 5-10 anos após a implantação (Lytle, 2004), devido à estenose do lúmen provocado por trombose (Gorbet & Sefton, 2004a) e hiperplasia da íntima (Lytle, 2004). Actualmente, os autoenxertos são a primeira escolha para a realização de anastomoses vasculares em vasos de pequeno calibre, mas há cerca de 30 % de casos em que esta opção cirúrgica não pode ser realizada devido a cirurgia anterior, a doença arterial periférica ou a variações anatómicas individuais (Nomi et al., 2002). O grande foco da investigação actual em cirurgia vascular está a ser conduzida pela necessidade de enxertos vasculares de pequeno diâmetro (< 6mm) altamente resistentes tanto a trombose e hiperplasia da íntima.

7.1. Enxertos vasculares autólogos.

Os enxertos vasculares autólogos incluem enxertos venosos e arteriais. A utilização de enxertos venosos foi testada experimentalmente pela primeira vez por Carel e Guthrie em 1906 (Carrel A & Guthrie CC, 1906). Apesar dos excelentes resultados na reconstrução arterial em termos de taxa de permeabilidade, o seu uso enquanto enxerto só foi retomado a partir do final da década de 40 do século XX. Os enxertos venosos utilizam preferencialmente a veia safena magna, sendo o procedimento padrão para revascularização do membro inferior, distalmente ao joelho. Para *bypass* coronários os enxertos venosos baseados na veia safena são apenas superados pelos enxertos arteriais autólogos (ex: artéria mamária interna esquerda) por apresentarem uma taxa de oclusão superior aos enxertos arteriais (Desai, Cohen, Naylor, & Fremez, 2004b; Goldman et al., 2004). Os enxertos venosos quando comparados com as próteses vasculares sintéticas na revascularização distal ao joelho apresentam uma taxa de permeabilidade de 73%, bastante superior aos resultados observados para prótese de ePTFE (47%) e

Dacron (54%)(Mamode & Scott, 2000). Proximalmente ao joelho, os enxertos venosos são utilizados para revascularização femuro-poplítea com resultados de taxa de permeabilidade de longo prazo superiores às próteses artificiais(Twine & McLain, 2010). As veias quando implantadas na circulação arterial sofrem uma adaptação funcional e estrutural que se caracteriza por um espessamento compensatório de todas as camadas da parede, por síntese de matriz extracelular em resposta ao aumento da tensão tangencial que a longo prazo podem levar a obstrução por hiperplasia da íntima (Dobrin et al., 1989; Morinaga et al., 1985). A hiperplasia da íntima a par da fibrose causada pela aterosclerose são complicações de longo prazo que podem levar à estenose com uma incidência de 20 a 25% ao fim de 8 a 15 anos de implantação(Berceli , 2010). A formação de aneurisma é outra das complicações que pode ocorrer a longo prazo com uma incidência de 10 a 20%(Berceli , 2010). Com o objectivo de suportar a parede externa dos enxertos venosos foram desenvolvidas redes permanentes ou biodegradáveis (Longchamp et al., 2014; Blakemore & Voorhees, 1954). Os enxertos arteriais autólogos apresentam as melhores performances funcionais e estruturais para a substituição vascular arterial. No entanto, em alguns pacientes ou em determinadas situações clínicas não estão disponíveis segmentos arteriais com um diâmetro e comprimento suficientes para reconstruir defeitos, concretamente em reconstruções arteriais de grande calibre. No procedimento de *bypass* aorto-coronário, o uso de enxertos arteriais representa o estado da arte e estão descritas a utilização da artéria mamária interna (Goldman et al., 2004), da artéria radial (Desai, et al., 2004a) e da artéria torácica interna(Sabik, et al., 2005). Em todos os estudos de longo e curto prazo os enxertos arteriais apresentam taxas de permeabilidade mais elevadas do que enxertos venosos autólogos e próteses sintéticas(Hanna et al., 1983; Desai et al., 2004b; Sabik, et al., 2005; Goldman et al., 2004; Lytle, 2004). Existem outros enxertos autólogos derivados de pele, pericárdio, fáscia e intestinos que foram testados experimentalmente em animais. No entanto, durante o período experimental foram evidenciados duas complicações que desencorajaram o seu uso em condições de pressão e fluxo elevado, nomeadamente a trombose precoce (48 horas pós-implantação) e a formação de aneurismas com subsequente rotura a longo prazo (Teebken & Haverich, 2002).

7.2. Enxertos vasculares homólogos (alloenxertos) e heterólogos (xenoenxertos).

A utilização de enxertos vasculares heterólogos ou xenoenxertos foi inicialmente tentada por Rosenberg *et al* em 1963(Rosenberg *et al.*, 1966). Um elevado número de complicações como trombose, aneurismas e infecções foram reportadas, desencorajando o seu uso para reconstruções arteriais. Os enxertos heterólogos de suínos e bovinos foram os únicos até ao momento a ser utilizados. Pretende-se com estes enxertos implantar uma estrutura descelularizada com a arquitectura de matriz extracelular que progressivamente vai ser repovoada com células nativas dando-se a biointegração. Para ultrapassar a rejeição por parte do sistema imunitário do receptor, estes enxertos eram sujeitos a procedimentos de descelularização. Na transplantação de tecidos de suíno para humanos, para o seu sucesso, considerou-se necessário a diminuição do principal antigénio, o epítipo 1-3 α -galactosil. A modificação genética de células ou tecidos, a imunossupressão temporária e a repopulação *in vitro* com células autólogas são estratégias adoptadas para melhorar a sobrevivência do enxerto.

Os xenoenxertos preparados a partir da artéria carótida, veia mesentérica ou ureter de bovinos têm sido utilizados para a preparação de fístulas arteriovenosas de acesso a hemodiálise e para a revascularização femuro-poplítea. Contudo, os resultados funcionais obtidos até ao presente evidenciaram taxas de permeabilidade muito baixas (16% e 26%, 1 mês e 14 meses pós-implantação respectivamente), uma incidência de 6% para aneurismas e uma incidência de infecções do enxerto de 6% a 7%, quando utilizados para procedimentos de revascularização infrainguinal tem limitado a sua utilização a pacientes de baixo risco [41]. As taxas de permeabilidade primária utilizando a veia mesentérica bovina (*Procol*) enxerto utilizado para a reconstrução infrainguinal foi de 0% a 3 meses numa pequena série de pacientes relatados por Kovalic *et al.*(Kovalic, Beattie, & Davies, 2002).

A utilização de xenoenxertos bovinos incluiu também o uso de ureteres bovinos descelularizados. Actualmente, este xenoenxerto tem sido utilizado para a realização de fístulas arteriovenosas (*SynerGraft model 100*) para acesso a hemodiálise(Chemla & Morsy, 2009). Os resultados da avaliação funcional são inferiores às próteses artificiais, existindo estudos onde as taxas de permeabilidade são baixas (28% e 29% ao fim de um ano)(Chemla & Morsy, 2009; Darby, *et al.*, 2006) contrariando os resultados obtidos em

cenários experimentais(Matsuura et al., 2004). Nos ureteres bovinos enquanto xenoenxertos os resultados funcionais pobres devem-se em parte, a uma incompleta descelularização que pode estimular a sua rejeição pelo sistema imunitário levando à formação de aneurismas, trombos vasculares e estenose(Kingston, Darby, & Roberts, 2009; Spark, et al., 2008). Clinicamente, este tipo de enxertos falhou também em procedimentos de revascularização infra-inguinais apresentando uma elevada formação de aneurismas (Tolva et al., 2007).

O uso de xenoenxertos de artéria carótida de bovinos para fístulas arteriovenosas de hemodiálise tem diversas vantagens tais como a sua disponibilidade, facilidade de implantação e adequação para acesso imediato após a implantação. Os xenoenxertos bovinos demonstraram taxas de permeabilidade de 76%, 69%, 63% e 51% em 1 a 4 anos (Brems, Castaneda, & Garvin, 1986). Em contraste, Mehta relatou uma taxa de permeabilidade primária de 16% e uma taxa de permeabilidade secundária de 39% para artéria carótida bovina num período de 3 anos(Mehta, 1991).

Os enxertos vasculares homólogos ou alloenxertos estão disponíveis para utilização clínica na forma criopreservada ou como veia umbilical humana descelularizada. Os enxertos venosos e arteriais criopreservados são actualmente utilizados para substituição arterial na ausência de enxertos autólogos ou na presença de infecção. Os tecidos venosos e arteriais recuperados a partir de doadores de órgãos são esterilizados com antibióticos em meio de cultura e armazenados em azoto líquido a -120°C a -196°C imersos em solução de dimetilsulfóxido a 15%-20%. A criopreservação não altera a integridade estrutural, a capacidade de crescer em meios de cultura de células, ou a capacidade de produzir prostaciclina nos vasos criopreservados. O reconhecimento da imunogenicidade dos enxertos criopreservados levou ao desenvolvimento de versões descelularizadas deste tipo de enxertos que induzem a produção de níveis mais baixos de anticorpos contra o antígeno leucocitário humano (ALH) da classe I e II(Hawkins et al., 2003).

Os enxertos criopreservados na versão arterial ou venosa têm sido usados em diversas aplicações. No entanto, na prática clínica os enxertos arteriais criopreservados (EAC) utilizam-se principalmente para a reconstrução arterial em locais infectados onde previamente estavam próteses artificiais(Berger et al., 2012). Esta utilização concreta aplica-se a localizações periféricas(Castier et al., 2005) ou aórticas(Leséche et al., 2001;

Khaladj et al., 2013). Outra da utilização dos EAC está relacionada com a criação de fístulas arteriovenosas em pacientes hemodialisados, onde os resultados obtidos para taxas de permeabilidade e complicações associadas não foram superiores aos materiais correntemente utilizados (ePTFE) (Madden, et al., 2005). Os enxertos venosos criopreservados foram também utilizados para revascularizações arteriais infra-inguinais quando os enxertos venosos autólogos (EVA) não estavam disponíveis (Farber & Major, 2004). A taxa de permeabilidade dos EVA é no entanto demasiado baixa (30% ao fim de um ano) para uma utilização corrente devendo-se utilizar este recurso terapêutico quando estiverem cumpridos dois critérios; ausência de enxertos autólogos e infecção do local de implantação (Farber et al., 2003).

A veia umbilical humana (VUH) é preparada a partir de cordões umbilicais colhidas na sala de parto e preparado e reticulada com glutaraldeído (Schoen & Padera, 2013). As proteínas solúveis e excesso de gel de *Wharton*, são extraídos com etanol, uma malha de *Dacron* pode ser aplicada na superfície externa servindo de suporte para reduzir o risco de dilatação aneurismal. Os enxertos de HUV são actualmente usados para revascularizações femuro-poplíteas (Neufang et al., 2007a) ou tibiais (Neufang et al., 2007b; Nevelsteen, et al., 1986) sendo também utilizadas para a formação de fístulas arterio-venosas de acesso à diálise (Dardik, Ibrahim, & Dardik, 1976; Berardinelli, 2006). Os enxertos de HUV podem igualmente serem utilizados para reconstrução de segmentos arteriais ou venosas (Khodadadi, Golcman, & Milleritzky, 1980) em situações traumáticas ou relacionadas com excisão de tumores abdominais (Gunasekaran, Mosna, & Savino, 2013).

Relativamente, às fístulas arterio-venosas os resultados das taxas de permeabilidade e de infecção exibidos pela VUH não demonstraram uma superioridade funcional relativamente às próteses artificiais sendo o seu uso abandonado (Wellington, 1981). No que diz respeito as revascularizações, os resultados obtidos por estudos recentes em larga escala demonstraram que nesta função particular as taxas de permeabilidade primárias ao fim de um ano são semelhantes (74% vs 84%) às das próteses sintéticas de ePTFE e *Dacron* apresentando-se como uma alternativa viável ao uso de enxertos autólogos de veia safena (Scharn et al., 2008; Neufang et al., 2007b). Uma das principais complicações relacionadas com a utilização de VUH está relacionada com a formação de aneurismas (Strobel, et al., 1996). No entanto a introdução de malhas de *Dacron* nestes enxertos e uma fixação melhorada com glutaraldeído estabilizaram a parede reduzindo a

incidência desta complicação de valores na ordem de 37% (Sommeling, Buth, & Jakimowicz, 1990) para uma incidência de 17% (Strobel et al., 1996).

7.3. Próteses vasculares sintéticas.

A ideia de um substituto sintético dos vasos sanguíneos tem mais de 500 anos desde que Vesalius substituiu experimentalmente segmentos arteriais em animais por segmentos de caules vegetais. No início do século XX foram desenvolvidas numerosas tentativas utilizando diversos materiais para a produção de uma prótese vascular sintética sem sucesso. A limitada disponibilidade de enxertos homólogos e autólogos levou a desenvolvimento de próteses vasculares sintéticas a partir da 2ª metade do século XX. Apesar de haver uma multiplicidade de materiais testados para o uso de próteses sintéticas apenas três biomateriais atingiram na actualidade a fase comercial da produção o politereftalato de etileno (PET) também conhecido pelo seu nome comercial *Dacron*, o politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) e o poliuretano (PU). Como já referido anteriormente, a performance funcional destes biomateriais em próteses vasculares de pequeno diâmetro (< 6mm) é inferior aos enxertos vasculares autólogos, daí que não sejam as primeiras escolhas terapêuticas. Apesar de ainda não ter sido desenvolvida uma prótese vascular sintética com um desempenho superior às próteses, as propriedades ideais de uma prótese vascular foram definidas ao nível da interação com o sangue, ao nível das características mecânicas e de biocompatibilidade (Tabela 1).

Tabela 1 – Características ideais de uma prótese vascular sintética (adaptado de (Teebken & Haverich, 2002))

Não tóxico	Resistente a hiperplasia da neoíntima	Fácil de fabricar
Resistente à infecção	Não carcinogénico	Facilmente disponível em vários diâmetros e comprimentos
Não trombogénico	Complacente	Flexível, elástico e resistente à compressão
Não irritante para os tecidos	Opcionalmente poderá ter a capacidade e libertar fármacos	Fácil de suturar

7.3.1. Politetrafluoroetileno expandido (ePTFE).

O PTFE foi inicialmente patenteado em 1937 pela empresa DuPont como *Teflon* para o isolamento eléctrico. Em 1969, Gore patenteou o ePTFE (Gore-Tex®) que é o material utilizado no fabrico de próteses vasculares. O ePTFE é fabricado por processos de fusão, de estiramento e extrusão que resulta num biomaterial material microporoso mais compatível com adesão firme dos tecidos envolventes quando implantado. A molécula ePTFE é bioestável e não sofre degradação biológica no corpo (Xue & Greisler, 2003). Em 1973, o ePTFE foi o primeiro material sintético a ser utilizado especificamente a ser utilizado para o acesso vascular (Matsumoto, Hasegawa, Fuse, Yamamoto, & Saigusa, 1973). Estruturalmente, as próteses de ePTFE consistem em membranas sólidas, finas de forma irregular alinhadas circunferencialmente, designadas por nós (*nodes*) ligados entre si por uma densa rede de fibrilhas com um comprimento que varia entre 1 e 100 µm. A porosidade das próteses de ePTFE é definida com base na distância entre os nós e existem dois tipos de próteses com base neste critério, ePTFE de baixa porosidade como distância entre poros de 30 µm e de alta porosidade de 60 µm (Zilla, et al., 2007). Nas próteses de alta porosidade é permitida um crescimento transmural de capilares dos tecidos envolventes em toda a sua espessura (Davids, et al., 1999). As próteses vasculares de ePTFE podem ser fabricadas com parede fina (0,4 µm) ou espessa (0,6 µm). São quimicamente inertes, impermeáveis, resistentes à dilatação circunferencial e apresentam um bom poder de retenção de suturas. Actualmente, existem no mercado diversas próteses vasculares de ePTFE das quais se destacam: a Gore-Tex® que apresenta um envelope externo densamente fabricado com o objectivo de reforçar a parede e reduzir a dilatação pós-implantação. A Impra Carboflo® é a outra prótese de ePTFE que apresenta um revestimento de carbono que aumenta a electronegatividade da superfície luminal, repelindo a adesão plaquetária e diminuindo a formação de trombos. Apesar dos resultados experimentais *in vitro* e *in vivo* (Akers et al., 1993; Wang et al., 2009; Tsuchida, et al., 1992) apontarem para um melhor desempenho funcional deste tipo particular de próteses. Os resultados da aplicação clínica são contraditórios. Em procedimentos de revascularização do membro inferior proximais em relação ao joelho demonstrou-se uma taxa de permeabilidade superior das próteses revestidas por carbono em relação às convencionais (Groegler, Kapfer, & Meichelboeck, 2002). No entanto, em revascularizações mais distais dos membros, as próteses revestidas não demonstraram ser estatisticamente superiores às próteses não revestidas relativamente às taxas de permeabilidade primária (33% vs. 30%) e secundária (43 % vs. 38%) ((Kapfer

et al., 2006). A adsorção de agentes anticoagulantes e antitrombóticos às próteses de ePTFE foi já realizada e comercializada através da marca Gore® Propaten®. O composto mais investigado até ao presente, foi a heparina que se imobilizada de forma covalente na superfície do lúmen. A heparina pode actuar através da libertação prolongada do material estabelecendo uma concentração efectiva no interface sangue-material ou através de mecanismos de que não implicam o consumo da heparina, mantendo-se a heparina activa na superfície da prótese. Apesar de haver uma extensa informação decorrente de estudos experimentais que indicam uma superioridade funcional deste tipo de próteses(Laredo, et al., 2003; Lin et al., 2004; Lin, et al., 2004). Os estudos de campo realizados recentemente com esta prótese não demonstraram uma melhor taxa de permeabilidade quando comparados com as próteses vasculares não modificados de ePTFE(Bellosta, Natalini, Luzzani, Carugati, & Sarcina, 2013). Na tentativa de reduzir a incidência de hiperplasia da íntima que ocorre como complicação da implantação de próteses de ePTFE em diversos locais por alterações na dinâmica do fluxo sanguíneo. O fabricante Bard®, desenvolveu uma prótese almofadada (*cuffed*), Dynaflo® com objectivo de tornar o fluxo da anastomose distal, exclusivamente em fluxo laminar reduzindo assim a formação HI(Naoum & Arbid, 2012). Os estudos preliminares, demonstraram uma melhoria na taxa de permeabilidade nas anastomoses distais de próteses colocadas em localizações distais ao joelho(Gulkarov et al., 2008), potencialmente por propiciarem um fluxo laminar, reduzindo desta forma a formação de HI.

Tal como as próteses de Dacron, as próteses de ePTFE com ID superior a 10 mm funcionam bem como substitutos da aorta com taxas de permeabilidade a 5 anos acima de 90%(Friedman, et al., 1995; Prager et al., 2001). Quando usadas para procedimentos de revascularização dos membros inferiores, proximalmente e distalmente ao joelho; as taxas de permeabilidade a 3 e 5 anos reduzem-se para valores de 61%(Post et al., 2001), 45%(Green et al., 2000) e 39%(Klinkert et al., 2004) respectivamente, enquanto os enxertos venosos autólogos apresentam para períodos de 5 anos taxas de permeabilidade na ordem dos 77%(Taylor, Jr., Edwards, & Porter, 1990) e 74%(Klinkert et al., 2004).

A endotelização *in vitro* da superfície luminal de próteses vasculares de ePTFE de baixo diâmetro demonstrou ser uma estratégia eficaz na melhoria da performance funcional (Meinhart et al., 1997; Deutsch et al., 2009).Conseguindo-se através desta estratégia uma superfície não trombogénica que se traduziu em valores de taxa de permeabilidade

de longo prazo (7 anos) semelhantes aos enxertos venosos autólogos (Meinhart et al., 1997; Deutsch et al., 2009).

7.3.2 Dacron.

A empresa DuPont patenteou as fibras de Dacron em 1950. As primeiras póteses vasculares de *Dacron* foram implantadas por Julian e DeBakey em 1957 e 1958 respectivamente (Xue & Greisler, 2003). As próteses de *Dacron* são formadas por um único elemento básico, as fibras de poliéster. Estas próteses são fabricadas através de dois processos: em malha (*Knitted*) e em tecido (*Woven*) (Xue & Greisler, 2003). Nas próteses em malha, as fibras são entrelaçadas formando poros de maior diâmetro permitindo um maior crescimento tecidual transmural, apresentam igualmente alta força tênsil e resistência à compressão externa, são rígidas e difíceis de suturar. Espirais ou anéis prostéticos podem ser fixados à superfície externa de modo a resistirem a forças de compressão externa (Xue & Greisler, 2003). Devido à sua elevada porosidade estas próteses de *Dacron* necessitavam obrigatoriamente de précoagulação para evitar o extravasamento transmural de sangue. Actualmente a selagem é feita pela incorporação de gelatina, albumina e colagénio durante o fabrico da prótese (Bearn, McCollum, & Greenhalgh, 1993). A albumina tem sido abandonada enquanto selante, porque é reticulada com glutaraldeído demorando dois meses até ser completamente reabsorvida (Cziperle et al., 1992) enquanto os outros selantes são degradados em apenas duas semanas (Jonas, et al., 1988; Scott et al., 1987). Entre as próteses em malha existe igualmente dois tipos de fabrico *warp-knitted* e *weft-knitted*. Nas próteses em tecido, a porosidade é muito mais limitada do que em malha. Adicionalmente são muito mais resistentes em relação à dilatação radial. Quando sujeitas a uma técnica de aveludamento (*Velour*) as superfícies tornam-se mais flexíveis sem alterações da permeabilidade. A técnica de aveludamento ao trazer as alças das fibras mais próximas da superfície melhora o crescimento tecidual transmural o que pode facilitar a endotelização (Haverich, et al., 1986). O *Dacron* apresenta uma boa estabilidade estrutural permanecendo implantado nos tecidos durante 10 ou mais anos sem degradação significativa. Contudo as próteses em malha apresentam uma predisposição para dilatação que está mais relacionada com a forma de fabrico do que com o polímero (Alimi, et al., 1994). Esta complicação pode raramente transformar-se em aneurisma e levar a uma rotura (Wilson, et al., 1997). As próteses de *Dacron* têm sido utilizadas principalmente para a substituição da aorta, nas formas simples ou bifurcada. Adicionalmente, também são utilizadas na forma de pequeno e médio calibre para

procedimentos de revascularização do membro (Xue & Greisler, 2003). Actualmente, o Dacron é também utilizado como remendo (*Patch*) na realização da técnica de endarterectomia na artéria carótida (Muto, et al., 2009). A performance funcional destas próteses é boa nas versões de grande diâmetro (ID > 10mm), apresentando taxas de permeabilidade acima de 90% ao fim de 5 anos quando colocadas na aorta (Friedman et al., 1995; Polterauer et al., 1992). No entanto, quando utilizadas na versão de pequeno calibre em procedimentos de revascularização dos membros em locais de baixo fluxo, a performance de longo prazo (5 anos) ao nível da taxa de permeabilidade é inferior a dos enxertos autólogos (Nomi et al., 2002) e semelhante as próteses de ePTFE (Nomi et al., 2002; van Det, et al., 2009). Ao nível funcional não existem diferenças no desempenho do Dacron fabricado em malha ou em tecido (Robicsek, et al., 1992).

7.3.3. Poliuretano (PU).

Os poliuretanos foram originalmente desenvolvidos na Alemanha em 1930 como espumas, para revestimentos de superfícies e como adesivos. Estes polímeros resultam da co-polimerização de três monómeros, onde a selecção de cada um dos monómeros e a sua quantidade de incorporação pode produzir biomateriais com diferentes características mecânicas. Como biomaterial, os PU foram aplicados inicialmente no revestimento de corações artificiais e no fabrico de dispositivos auxiliares da função do ventrículo esquerdo (Boretos & Pierce, 1967; Pierce, et al., 1969). As propriedades elásticas e a excelente complacência do PU, associada a uma biocompatibilidade aceitável (Hess et al., 1992) fazem deste polímero um biomaterial ideal para a utilização em próteses vasculares de pequeno diâmetro. Adicionalmente, as próteses vasculares de PU são consideradas mais complacentes do que o ePTFE e o *Dacron*, contribuindo para um menor desenvolvimento de HI. A primeira geração de próteses vasculares de PU que incorporavam poliésteres (Vascugraft®, Bbraun®) (Marois et al., 1996; Zhang et al., 1997) e polieteruretanos (PulseTec®) (Santerre & Labow, 1997) apresentavam biodegradação e modificação química *in vivo* por hidrólise e oxidação respectivamente. A prótese VECTRA® é uma prótese polieteruretano utilizada para acesso vascular em hemodiálise. Esta prótese apresenta uma arquitectura em três camadas: uma camada interna microporosa com revestimento interno anti-adesão plaquetária de siloxano; uma camada intermédia de Thoralon® que é selante e lhe confere resistência e uma terceira camada externa microporosa que permite crescimento tecidual (Glickman et al., 2001). Quando comparada com próteses de ePTFE de acesso vascular em hemodiálise apresenta várias vantagens. Uma das limitações do acesso vascular em hemodiálise é a necessidade de

maturação ou incorporação do tecido antes se poder aceder à prótese. O intervalo de tempo desde a realização da fístula arteriovenosa até à de maturação varia de 6 semanas a 6 meses para enxertos autólogos venosos e de 10 a 14 dias utilizando próteses sintéticas(Rocco, Bleyer, & Burkart, 1996). Este atraso geralmente exige a colocação de um cateter venoso central temporário em pacientes que necessitam de hemodiálise urgente(Rocco et al., 1996). Estima-se que o paciente hemodialisado exige aproximadamente 2 a 3 cateteres venosos centrais por paciente por ano, o que, para além do aumento do custo, expõe o paciente ao risco de complicações associadas com a inserção do cateter(Rocco et al., 1996; Glickman et al., 2001).

A prótese de poliuretano Vectra® apresenta um início de canulação mais precoce e uma melhor hemostase após a canulação por causa da sua capacidade de vedação melhorada quando comparadas com a prótese de ePTFE. Concretamente é possível aceder a prótese Vectra® nos primeiros 8 dias em 89% dos casos e apresenta taxas de permeabilidade de 44% aos 12 meses(Glickman et al., 2001). No caso das próteses de ePTFE com a mesma funcionalidade não é possível aceder à fístula nos primeiros oito dias e a taxa de permeabilidade após 1 ano de implantação não ultrapassa os 36%(Glickman et al., 2001).

Uma nova geração de PU baseia-se no polímero de policarbonato que são mais resistentes à biodegradação por oxidação e hidrólise (Tanzi, Fare, & Petrini, 2000; Salacinski et al., 2002). Experimentalmente, demonstrou-se uma endotelização mais rápida e uma estabilização da formação da neo-íntima mais rápida do que ePTFE(Jeschke, et al., 1999). Diversos estudos pré-clínicos em animais comprovaram a estabilidade a longo prazo(Seifalian et al., 2003; Jeschke et al., 1999) deste grupo de PU previamente comprovada *in vitro*. Recentemente, o policarbonatouretano foi testado num cenário clínico sob a forma de prótese de acesso vascular para hemodiálise (AVflo™) exibindo resultados de taxas de permeabilidade e tempos médios de acesso vascular comparáveis a próteses de ePTFE e Vectra® (Ferraresso, et al., 2013). Além do mais, esta prótese apresenta na superfície externa uma espiral que tem como objectivo reforçar a resistência à compressão externa (*Kinking*) que é como sabemos uma das desvantagens de próteses baseadas em PU.

8. Técnicas de anastomose vascular.

A investigação em microcirurgia tem produzido um grande número de técnicas para a realização de anastomoses vasculares em vasos de pequeno, médio e grande calibre. As técnicas de anastomose podem ser classificadas em tipos de anastomose e no método de fixação utilizado para realizar a anastomose.

8.1. Tipos de anastomose

As anastomoses vasculares podem ser divididas em diferentes tipos de acordo com técnica utilizada para a sua construção em:

- anastomose término-terminal
- anastomose término-lateral
- anastomose término-terminal com interdigitação telescópica
- anastomose término-terminal com ramificação
- técnicas de *cuffing*

A **anastomose arterial término-terminal (T-T)** foi a técnica (Figura 4) inicialmente usada em microcirurgia por ser a técnica intuitivamente mais apropriada para colocar em contacto duas estruturas tubulares. Classicamente, os vasos a anastomosar são posicionados topo a topo com um *clamp* microvascular. Posteriormente, inspeccionam-se os topos e a íntima dos vasos para se verificar a ausência de resíduos trombóticos, assim como o excesso de tecido ou irregularidades, para se proceder à sutura ou outro método de fixação. A sutura neste tipo de anastomoses segue dois tipos diferentes de procedimento, a **biangulação simétrica** em que dois pontos são colocados em duas posições diametralmente opostas em 180º, servindo como pontos de referência para a subsequente sutura da parede anterior e posterior do vaso. A penetração ou transfixação da parede posterior aquando da sutura da parede anterior é a principal complicação desta técnica, principalmente na anastomose de vasos de menor diâmetro (inferior a 1mm). Este erro técnico pode ser evitado dilatando o lúmen do vaso antes de iniciar a sutura através de irrigação, com a introdução de pinças microcirúrgicas e compostos vasodilatadores locais que tem como objectivo afastar as duas paredes. A **biangulação excêntrica** é uma técnica introduzida por Cobbet consiste na colocação de duas suturas

de referência separadas por 120° criando um plano paraequatorial quando é exercida tracção sobre as mesmas (Cobbett, 1967). A parede anterior torna-se mais curta e tensa e a posterior mais longa e laxa com o consequente afastamento da última em relação à primeira, eliminando-se o problema da transfixação durante da parede anterior. Esta técnica é que mais frequentemente se pratica na anastomose término-terminal. A visualização da parede posterior do vaso consegue-se por rotação dos *clamps* vasculares. A sutura contínua, apresenta algumas vantagens como maior rapidez de execução, necessidade de menor número de nós na anastomose e melhor distribuição da tensão da sutura ao longo da parede do vaso. Na relação hemodinâmica entre fluxos provenientes de vasos de diferentes calibre, a anastomose entre um vaso de pequeno calibre e um de maior diâmetro deve ser evitada devido a turbulência gerada, enquanto o inverso causa um fluxo menos turbulento. Quando a discrepância entre vasos é demasiado grande, o sucesso da anastomose T-T diminui. Na situação de discrepância entre diâmetros ou de incongruência vascular e se a dilatação do vaso não é suficiente poderemos realizar uma secção oblíqua com um ângulo de 30° , seguida de dilatação, existem algumas soluções para resolver este problema. Na prática, se a diferença de diâmetro é inferior a 50% é suficiente dilatar o vaso mais pequeno. Se a diferença é superior a 50% é preciso seccionar de forma oblíqua e depois dilatar. Em vasos onde a relação da discrepância é maior que 2:1 torna-se preferível o recurso a enxertos venosos de interposição ou uma anastomose término-lateral (Mueller, et al., 2006).



Figura 4 – Anastomose término-terminal entre a artéria carótida comum e prótese de PVA/Dx.

A **anastomose término-lateral (T-L)** consiste em suturar a extremidade de um vaso, à parede lateral de outro vaso, mediante a prévia realização de um orifício, (Rao, Thomas,

& Jr., 1970). O ângulo de anastomose deve ser igual a 90° ou mais agudo ainda no sentido do fluxo. Em relação ao ângulo de entrada, embora a esmagadora maioria dos autores considere preferível um ângulo o mais agudo possível, estudos efectuados por Nam e Acland não encontraram diferenças significativas no fluxo em anastomoses T-L efectuadas a 45° e 90° no cão(Nam, et al., 1978). Quanto à forma da arteriotomia a abordagem pode ser por uma fenda longitudinal, transversal, periforme ou elíptica(MacDonald, 2005). Esta última apresenta a vantagem técnica de permitir a identificação e separação dos bordos da arteriotomia resultando numa menor probabilidade de transfixação da parede inferior a quando da sutura. A arteriotomia realizada por fenda longitudinal apresenta algumas vantagens em relação às outras técnicas. O procedimento é simples podendo ser executado com microbisturi num ângulo de 15° a 30°; a fenda pode ser aumentada se necessário ou reparada se demasiado longa já que nenhuma porção da parede arterial é excisada como na técnica clássica(Gu, et al., 2006). Na anastomose T-L, a colocação dos *clamps* vasculares na artéria receptora obedece a uma sequência, colocando-se o primeiro o *clamp* distal e só depois o proximal no sentido de promover uma dilatação arterial facilitando o seu manuseamento. Seguidamente procede-se à apreensão da parede vascular com uma pinça de microcirurgia e realiza-se uma arteriotomia elíptica ou longitudinal no vaso receptor com microtesoura. A sutura deste tipo de anastomoses segue duas abordagens, sendo a mais vulgarmente utilizada a que consiste na colocação de duas suturas de referência nos dois extremos da arteriotomia suturando posteriormente de forma contínua a parede posterior e anterior; a outra opção consiste na sutura por pontos interrompidos colocados no sentido dos ponteiros de relógio, completando o perímetro da anastomose(Hsu & Hsieh , 2003).

A **anastomose término-terminal com interdigitação telescópica (Figura 5) (*sleeve anastomosis*)** foi inicialmente descrita por Lauritzen em 1978 consiste em ligar a adventícia do vaso dador (extremidade proximal do vaso) ao bordo do vaso receptor (topo distal do vaso) introduzindo-se no lúmen do vaso como um telescópio sendo a sua fixação efectuada somente por dois pontos de sutura colocados em planos verticais (Lauritzen, 1978). Este trabalho foi realizado inicialmente em artérias femorais de ratos(Lauritzen, 1978) utilizando duas alças de sutura que foram utilizadas como guia e cola de fibrina para reforçar a anastomose. No entanto, em grandes artérias com alto fluxo existe o risco de haver separação da anastomose e mais suturas são necessárias aumentando o risco de estenose Os apoiantes desta técnica evocam várias vantagens:

mais rápida de executar, menor dissecação da íntima, altas taxas de permeabilidade, um número baixo de aneurismas repostados no local da anastomose e maior resistência a tensão circunferencial (Zhong, Vaughan , & Bowen , 2003). Recentemente foi reportado uma modificação desta técnica excutada experimentalmente nas artérias carótidas em ovelhas que facilita a sua execução e reduz as complicações verificadas na técnica inicial (Peirovi et al., 2005).

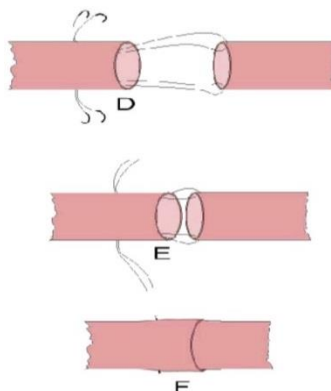


Figura 5 – Etapas de realização da anastomose término-terminal com interdigitação telescópica (adaptado de Peirovi et al., 2005).

A **anastomose término-terminal com ramificação** é uma modificação da anastomose término-terminal no qual uma ramificação arterial ou uma veia tributária presente no local da anastomose seleccionado é utilizado como vaso receptor. O vaso dador é anastomosado com a ramificação venosa ou arterial através da técnica de anastomose T-T (Zhong T et al., 2003).

As **técnicas de cuffing**, inicialmente foram adoptadas para prevenir o derrame na área anastomosada. Actualmente porém, temos o conhecimento que as pequenas hemorragias se resolvem sem intervenção do cirurgião e hemorragias maiores podem ser resolvidas com a adição de suturas na camada adventícia (Zhong T et al., 2003).

8.2. Métodos de fixação ou coaptação.

Diversos métodos de fixação das anastomoses têm sido descritos na bibliografia ao longo das últimas décadas. Os principais objectivos dos diversos métodos de fixação prendem-se com a rapidez, simplicidade de execução sem baixar as taxas de permeabilidade reduzindo por isso o risco de trombose intravascular. Os métodos de fixação devem ter

em conta os três principais factores (tríade de *Virchow*) que levam á trombose vascular nomeadamente o baixo fluxo sanguíneo, a lesão na parede vascular e as alterações nos constituintes celulares do sangue de modo a reduzir ao mínimo as complicações associadas a estas metodologias. Os métodos de fixação das anastomoses dividem-se: anastomoses por sutura, técnicas de *laser*, electrocoaptação, dispositivos mecânicos e colas e adesivos anastomóticos.

As **anastomoses por sutura** são o método de fixação mais utilizado existindo no entanto variações no material de sutura utilizado e nos métodos de colocação das suturas. Os materiais de sutura têm evoluído ao longo dos anos com o refinamento das técnicas de anastomose tornando-se cada vez mais finos. Os biomateriais *Nylon* (nome genérico que incluem a família dos polímeros poliamidas) a par do polipropileno e do *Dacron* são os mais utilizados em anastomoses vasculares devido á sua facilidade de uso, a força tênsil satisfatória para aguentar a tensão circunferencial provocada pela pressão arterial pulsátil e pela baixa reacção inflamatória desencadeada por estes biomateriais. As desvantagens destes materiais de sutura relacionam-se com a segurança dos nós que são considerados menos seguros, quando comparados com os fios de sutura multifilamentosos (Zhong, et al., 2003). Outro aspecto de importância na selecção e desenvolvimento dos materiais de sutura vasculares, é a dimensão da agulha que deve ser o menor possível para não provocar um orifício demasiado grande que gera maior hemorragia e que causa igualmente mais danos na íntima promovendo a trombose vascular (Pitt & Humphries, 1982). Adicionalmente, a agulha deve ter uma ponta aguçada, um corpo de secção circular e a transição para o fio deve ser suave. Antecedendo a sutura, os topos de anastomose devem ser aproximados até se tocarem sem tensão para que os tecidos entrepostos entre as suturas não fiquem estrangulados (Zhong, et al., 2003). Em relação a técnica de sutura, esta deve ser executada com o menor número de suturas possível para assegurar a impermeabilização da anastomose. O espaçamento aconselhado entre suturas deve ser uniforme e não deve ser inferior a 0,3 mm (Hayhurst & O'Brien, 1975). A adesão a este princípio reduz a incidência de necrose da média e de oclusão do vaso. A sutura deve passar por todas as camadas porque causa menos danos na média e íntima do que as suturas colocadas parcialmente na parede do vasos. A técnica de sutura é um factor crítico para a taxa de permeabilidade da anastomose. Uma má técnica de sutura pode causar estenose do lúmen no local de anastomose, distorcendo a parede do vaso e aumentando a probabilidade de trombose vascular. Para contornar o problema da distorção durante a sutura, Harashina reparou que duas ou três últimas suturas são fundamentais para o sucesso da anastomose pela influência que tem

na distorção do vaso deixando por isso estas suturas sem nó até que as suturas estejam colocadas na totalidade(Harashina, 1977). O fio de sutura utilizando em anastomoses vasculares deve ter o menor diâmetro possível, recorrendo-se ao fio 10/0 ou 9/0 USP para microanastomoses vasculares e 7/0 e 6/0 para vasos de médio e grande calibre respectivamente(Zhong T et al., 2003).

O **laser** foi outra das técnicas utilizadas para a fixação de anastomoses vasculares. Os feixes de laser induzem necrose de coagulação por energia térmica nos locais de anastomose evitando o recurso a suturas. Estudos histológicos referem que o processo de cicatrização não é diferente de outras técnicas de anastomose(Bailes, et al., 1987). Apresenta também outras vantagens em relação às suturas nomeadamente a rapidez no uso, a ausência de trauma pela passagem da agulha, a ausência de suturas no local da sutura previne a formação de reacção de corpo estranho e menos variação de resultados por diferentes níveis de experiência dos cirurgiões(Zhong, et al., 2003). Diversos tipos de feixes de *laser* tem sido investigados para aplicação em anastomoses de artérias de pequeno calibre sendo os mais utilizados o *Neodymium: yttrio-alumínio-garnet* (YAG)(Jain, 1990) e o *laser* de CO₂ (Wolf-de Jonge, et al., 2008)com resultados comparáveis as anastomoses por sutura (Basu et al., 1988; Quigley, et al., 1986). Uma das principais desvantagens pela utilização de *laser* consiste na formação de aneurismas no local da anastomose(Wolf-de Jonge et al., 2008; Wolf-de Jonge, Beek, & Balm, 2004).

A **electrocoaptação** é uma técnica de anastomose em que o princípio subjacente consiste em provocar uma aderência por coágulos localizados na anastomose através da passagem de corrente eléctrica de alta frequência no tecido com fórceps eléctricos bipolares(Zhong et al., 2003). A grande desvantagem desta técnica prende-se com a determinação da corrente necessária para provocar a quantidade certa de coagulação(Zhong et al., 2003). Por essa razão o seu uso permanece restrito a cenários experimentais.

Os **dispositivos mecânicos de anastomose** têm sido investigados como alternativa as suturas vasculares clássicas com o intuito de evitar as consequências no crescimento e distensão vascular após a anastomose. O uso destes dispositivos mecânicos ainda não foi generalizado à prática cirúrgica. Em estudos experimentais o seu uso demonstrou a capacidade de produzir anastomoses vasculares com rapidez e com segurança. No entanto, o seu uso é tecnicamente difícil e requiere treino e uma aprendizagem lenta. No

caso particular dos dispositivos acopladores, estes são demasiados grandes para serem manipulados por baixo do microscópio cirúrgico. Outra das desvantagens é que necessitam de demasiado tecido vascular para uma boa eversão na anastomose. Este sistema pode ser adequado para anastomoses venosas T-T mas, para as anastomoses arteriais, revela-se pouco eficaz, já que a maior parte da espessura da parede arterial e consequente dificuldade de eversão apresenta-se como a principal desvantagem para o seu uso. Existe apenas um dispositivo acoplador disponível comercialmente da empresa 3M, tendo sido reportado o seu uso com sucesso em anastomoses microvasculares (Shindo, et al., 1996; Ahn, et al., 1994) e em anastomoses venosas (Denk, et al., 1995). De entre os dispositivos mecânicos, os agraes vasculares são os que apresentam melhor facilidade de exequibilidade para substituir as suturas clássicas mas apenas para vasos de maior calibre, pois não estão adaptados para pequenas artérias. Outras desvantagens incluem a necessidade de vasos normais com segmentos livres relativamente longos para permitir a eversão dos topos vasculares e com o facto de serem demasiado largos para permitir as anastomoses sob o microscópio cirúrgico (Leppaniemi et al., 2000). Experimentalmente têm sido testados clips vasculares com objectivo de reduzir o tempo da sutura das anastomoses. Estes dispositivos demonstraram uma performance funcional e estrutural semelhante às suturas de polipropileno em anastomoses vasculares (Caiati, et al., 2000; Calles-Vazquez, et al., 2007). Para minimizar as trombozes vasculares decorrentes da hiperplasia da íntima que ocorre no local de anastomose por suturas foram desenvolvidos anéis vasculares em titânio que são suturados em conjunto com os topos vasculares aumentando o diâmetro do lúmen entre 20% a 50% (Wei, et al., 2009). Em anastomoses arteriovenosas realizadas com este tipo de técnica em coelhos verificou-se uma melhor taxa de permeabilidade (100%) às 12 semanas quando comparado com a anastomose por sutura clássica (75%). O exame histológico revelou também que a espessura da íntima era menor no grupo experimental que recebeu o anel de titânio inferindo-se que a interposição deste anel causando a dilatação da anastomose T-T previne a estenose do lúmen a longo prazo (Karamursel et al., 2001). Na prática clínica este dispositivo foi já introduzido em anastomoses aorta-aórtica e aorta-coronária com bons resultados (Wei, et al., 2009).

Um grande número de **colas e adesivos tecidulares** tem sido desenvolvidos para aplicação em microcirurgia. Entre os adesivos e colas tecidulares mais utilizados encontramos as resinas de poliuretano, o cianoacrilato (Saba, et al., 2007; Gürhan Ulusoy, et al., 2009; Akhtar, 2010; Lumsden & Heyman, 2006) e a cola de fibrina (Cho &

Júnior, 2008; Cho, et al., 2009). A cola de fibrina mimetiza as etapas finais da cascata de coagulação para produzir um coágulo de fibrina fisiológico (Spotnitz, 2001) O uso da cola de fibrina em anastomoses microvasculares foi iniciado por Pear *et al* em 1977 (Pearl, et al., 1977). O seu uso apresenta diversas vantagens como a simplicidade da técnica, a rapidez na execução com consequente redução no tempo da anastomose e permite reduzir o número de suturas a colocar na microanastomose (Cho & Júnior, 2008). Apesar das vantagens, as taxas de permeabilidade são semelhantes nas anastomoses produzidas por técnicas convencionais de sutura (Cho & Júnior, 2008).

Os cianoacrilatos são adesivos formados pela polimerização de monómeros de cianoacrilato, quando em contacto com a água, soro fisiológico ou uma base fraca (Zhong T et al., 2003). Apesar de serem eficazes na fixação de anastomoses vasculares (Lumsden & Heyman, 2006; Saba et al., 2007; Gürhan Ulusoy et al., 2009; Akhtar, 2010), o seu uso clínico mais generalizado, tem sido evitado devido a dados controversos no que diz respeito à sua biocompatibilidade e consequente capacidade para gerar reacções inflamatórias (Zhong, et al., 2003). No entanto, têm sido desenvolvidos cianoacrilatos como o etilo 2-cianoacrilato com melhor perfil de biocompatibilidade (Kaplan, et al., 2004; Kaplan, et al., 2004; Kaplan & Baysal, 2005)

9. Engenharia de tecidos em investigação de cirurgia vascular.

Ao fim de décadas de investigação, ainda não foi desenvolvida uma prótese sintética de baixo diâmetro (PSBD) (<6 mm) com uma performance funcional e estrutural que consiga ultrapassar os principais problemas colocados pela implantação destas próteses, nomeadamente a trombose vascular aguda, a hiperplasia da íntima nos locais de anastomose, a formação de aneurisma e a infecção (Kakisis, et al., 2005). A velocidade do fluxo sanguíneo nos vasos de pequeno calibre coloca uma série de desafios no desenho de próteses biológicas ou sintéticas não encontrados na produção de substitutos arteriais de elevado calibre (ID=10 mm), onde as próteses sintéticas de *Dacron* e ePTFE obtiveram um elevado sucesso.

Embora os enxertos venosos e arteriais autólogos sejam a primeira escolha terapêutica, muitos pacientes não apresentam vasos adequados por doença arterial periférica, por amputação ou por colheita prévia. Adicionalmente, esta estratégia terapêutica requiere uma segunda intervenção cirúrgica para obter o enxerto autólogo. Daí que a engenharia

de tecidos (ET) tenha emergido como uma opção para a produção de vasos de pequeno diâmetro que apresentem características que ultrapassem os problemas referidos anteriormente para as próteses sintéticas.

O objectivo da engenharia de tecidos consiste na produção de um vaso sanguíneo artificial estável e funcional que não contém qualquer material sintético (Isenberg, Williams, & Tranquillo, 2006). Para conseguir este objectivo, diversos investigadores exploraram o uso de células de tecido arterial ou venoso combinada com vários tipos de matrizes de origem biológica ou sintética para construir estruturas tubulares e sujeitá-las a estímulos mecânicos e químicos numa tentativa de desenvolver um enxerto vascular de baixo diâmetro apto para substituir segmentos de vasos com sucesso (Isenberg et al., 2006). A primeira tentativa para o fabrico de um vaso sanguíneo foi conseguida por Weisenberg e Bell em 1986 em que se construiu um tubo de colagénio onde foram cultivadas células endoteliais e musculares lisas que se organizaram respectivamente num endotélio e uma camada muscular funcionais (Weinberg & Bell, 1986). No entanto só doze anos depois, L'Heureux (L'Heureux, et al., 1998) conseguiu produzir um vaso sanguíneo completo, com três camadas funcionais e com a capacidade para suportar uma pressão interna superior a 2000 mmHg, sendo implantado num modelo animal por um período de tempo curto. Mais recentemente, em 2006, (L'Heureux et al., 2006) o mesmo autor conseguiu produzir por ET um vaso completamente funcional com células colhidas em pacientes humanos e testado num modelo animal durante 8 meses com sucesso. Em 2007, o mesmo autor conseguiu produzir um enxerto arterial autólogo através de ET, para a realização de uma fístula arteriovenosa com o objectivo de construir um acesso vascular de hemodiálise (L'Heureux et al., 2007). Os ensaios clínicos realizados num pequeno número de pacientes (três) demonstraram que é possível manter um vaso produzido por ET permeável por um período superior a 1 ano sem complicações maiores (L'Heureux et al., 2007). No entanto, o primeiro uso clínico de uma construção vascular produzida *in vitro* utilizando um copolímero de policaprolactona-ácido polilático semeado com células (células endoteliais e musculares lisas) colhida de uma veia periférica, foi descrita por Shin'oka *et al.* (Shin'oka, Imai, & Ikada, 2001) Com o objectivo de reconstruir uma via de saída pulmonar de baixa pressão em pacientes pediátricos com defeito cardíaco congénito na artéria pulmonar.

Diversas técnicas foram empregues para o desenvolvimento *in vitro*, *ex vivo* (ou *in situ*) e até *in vivo* (Daly, Campbell, Walker, & Campbell, 2004) de vasos sanguíneos (Figura 6).

No entanto apenas as técnicas *in vitro* ou *ex vivo (in situ)* permitirão uma produção em grande escala

Para a produção de vasos sanguíneos por engenharia de tecidos (VSET) foram estabelecidos critérios de *design* com o objectivo dos vasos produzidos suportarem o exigente ambiente mecânico do sistema cardiovascular. Independentemente do método ou técnica de produção foram estabelecidos os seguintes 3 componentes para que esses critérios se cumpram (Mitchell & Niklason, 2003; Niklason, 1999):

- i) apresentarem um componente biocompatível com elevada força tênsil que proporcione um suporte mecânico (fibras de colagénio ou análogos);
- ii) apresentarem um componente elástico biocompatível que proporcione reserva elástica e previna a formação de aneurismas (fibras de elastina);
- iii) apresentarem um endotélio confluyente não activado que previna a trombose intravascular.

Existem outros componentes secundários que convém referir nomeadamente: uma capacidade de regeneração aceitável que não resulte em hiperplasia, em inflamação ou cápsula fibrosa espessa; uma capacidade de biointegração de modo a que o enxerto se torne indistinguível do vaso receptor e exiba propriedades fisiológicas básicas como a vasodilatação e a vasoconstrição e por último a capacidade de suportar uma pressão de *burst* superior a 1700 mmHg (L'Heureux et al., 2007). Outro aspecto desejável é a disponibilidade “*off the shelf*”, uma vez que muitos pacientes apresentam afecções que ameaçam a vida e não podem esperar demasiado tempo por estes recursos terapêuticos. Actualmente existem três abordagens principais (Tranquillo, 2002) que permitem produzir VSET que cumprem os critérios acima referidos: tecidos descelularizados, camadas de células ou de tecidos através do método de *self assembly* e matrizes de hidrogéis ou biopolímeros.

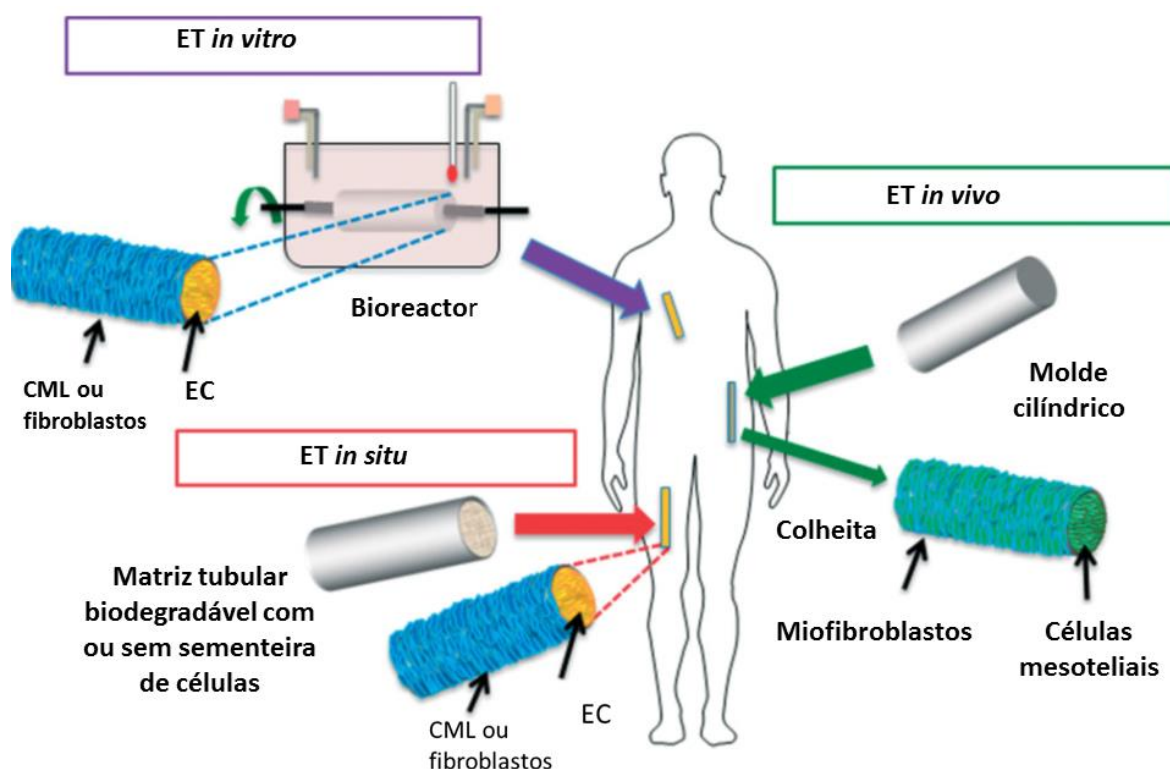


Figura 6 – Diagrama representativo das diferentes abordagens da engenharia de tecidos para o fabrico de vasos sanguíneos (adaptado de Li, et al., 2014).

9.1. Tecidos descelularizados.

Os tecidos descelularizados tem a vantagem de serem inteiramente compostos de matriz extracelular (MEC) dando-lhe numerosas vantagens em termos de biocompatibilidade e propriedades biomecânicas. Ao contrário das outras abordagens, os enxertos vasculares construídos desta forma são implantados sem células partindo-se do pressuposto que são posteriormente colonizados por células autólogas. Estes tecidos podem ter origem vascular ou não vascular. A remoção das células é conseguida através de uma combinação de detergentes, inibidores de enzimas e tampões. Este processo tem impacto na arquitectura do tecido, resultando em diminuição da força tênsil e da complacência (Dahl, et al., 2003a). Uma retracção em relação ao volume original é também observada provavelmente como resultado da remoção dos proteoglicanos pelos detergentes (Dahl, et al., 2003b). Como referido anteriormente, os xenoenxertos processados desta forma tem uma elevada prevalência de formação de aneurismas, infecções e trombooses vasculares sendo o seu uso abandonado (Tolva et al., 2007). Os

enxertos homólogos produzidos por este processo apresentam igualmente uma performance funcional inferior a dos enxertos autólogos e próteses tendo por isso um uso muito restrito(Farber & Major, 2004; Farber et al., 2003) Adicionalmente, a presença de antigenicidade residual pode impedir a sua reendotelização (Sung et al., 1997). Um outro tecido acelular usado em ET com sucesso é a matriz derivada da submucosa do intestino delgado (SIT). A SIT é preparada mecanicamente removendo camadas de mucosa e músculo do intestino delgado, as células são lizadas com uma solução hipotónica para posterior remoção com ácido paracético e um tampão salino(Badylak, et al., 1998). Este processo resulta num material de matriz extracelular composto por aproximadamente 90% de colagénio do tipo I, fibronectina, factores de crescimento, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas(Badylak et al., 1998). A principal vantagem deste material é que promove remodelação e regeneração específica por parte do hospedeiro. Após a implantação ocorre uma rápida neovascularização e infiltração celular pelo hospedeiro, seguido de uma remodelação estrutura e composicional da SIT que pode estender-se até aos 6 meses(Robotin-Johnson, et al., 1998; Padalino et al., 2012). Experimentalmente, num modelo murino foi possível demonstrar uma completa endotelização ao fim de 30 dias pós-implantação(Padalino et al., 2012). A reacção inflamatória produzida pela implantação deste implante é negligenciável considerando-se que os enxertos baseados em SIT são biocompatíveis (Padalino et al., 2012). Uma das principais preocupações relacionadas com utilização deste material para o fabrico de enxertos vasculares prende-se com a resistência mecânica *in vivo*. No referido estudo de Padalino *et al*(Padalino et al., 2012) observou-se uma ausência de fibras elásticas durante todo o processo de remodelação e integração do enxerto de SIT. A sua ausência é bastante frequente em VSET ou quando presentes não se encontram organizadas possivelmente pela dificuldade das células musculares lisas em sintetizarem fibras de elastina *in vitro* (Lee, Stolz, & Wang, 2011). As fibras de elastina desempenham um papel fundamental na elasticidade e complacência do vaso e por conseguinte nas propriedades mecânicas dos vasos sanguíneos. Apesar de no modelo murino não se ter observado a formação de aneurismas. Existem relatos de implantação de VSET construídos com SIT em artérias de grande calibre no cão sem formação de aneurismas e com elevadas taxas de permeabilidade(Lantz et al., 1993; Lantz, et al., 1992; Sandusky, Lantz, & Badylak, 1995; Sandusky, et al., 1992; Huynh et al., 1999). Em modelos animais de grande porte (ovelha) pelo contrário foi observado a formação de aneurismas a longo prazo (6 meses) em VSET construídos com SIT por síntese insuficiente de fibras de elastina (Opitz et al., 2004). Tal facto questiona a segurança a longo prazo destas construções para

substituição de segmentos de vasos e sugere que se façam mais estudos pré-clínicos de longo prazo em modelos animais de grande porte. Clinicamente, este tipo de enxertos tem aplicação em cirurgia vascular pediátrica porque após implantados acompanham o crescimento do hospedeiro, factor fundamental neste grupo de pacientes. Recentemente foi reportado que o uso de remendos (*Patch*) de SIT pode representar um material eficaz e seguro para a reparação de doenças cardíacas e vasculares congénitas em crianças, por evitarem a necessidade de uma segunda cirurgia causada pela incompatibilidade crescimento quando se aplicam próteses sintéticas (Scholl, et al., 2010). Com base nesta experiência, começaram a utilizar este material para reconstrução pulmonar da artéria pulmonar e do folheto da válvula pulmonar em doença cardíaca congénita, como a tetralogia de *Fallot*, em que a técnica clássica impede um funcionamento normal da válvula pulmonar, com excelentes resultados (Padalino, Vida, & Stellin, 2009).

9.2. Formação de vasos sanguíneos por organização de camadas de células ou de tecidos através de do método de *self assembly*.

L'Heureux *et al* (L'Heureux et al., 1998) investigaram uma nova técnica para a produção de vasos artificiais, baseada exclusivamente na cultura de células humanas, sem o uso de uma matriz de suporte para as células. Neste método as células produzem a sua própria matriz de suporte. As células musculares lisas colhidas de uma veia umbilical humana e fibroblastos obtidos da pele humana foram cultivadas durante 30 dias, momento em que ambos os tipos de células tinham formado lâminas celulares coesas constituídas por células e matriz extracelular que foram libertadas manualmente a partir dos frascos de cultura. As lâminas de células musculares lisas foram em seguida, enroladas em torno de um mandril de suporte para construir a média do vaso. Após 1 semana de maturação da camada média, uma lâmina de fibroblastos foi enrolada em torno da camada média para formar a adventícia. Depois de uma maturação de 7 semanas, o mandril foi removido e as células endoteliais colhidas de uma veia umbilical foram semeadas no lúmen tendo-se produzido uma camada confluenta de células endoteliais ao fim de uma semana.

O produto final foi um vaso com uma parede organizada em três camadas semelhante a uma artéria humana. O VSET obtido por este método conseguiu suportar uma pressão de *burst* igual a 2594 ± 501 mmHg, que é um valor significativamente superior ao suportado pela veia safena humana (Konig et al., 2009; L'Heureux et al., 1998). Adicionalmente demonstrou boas características de suturabilidade e de manuseamento. Além disso, este VSET não mostrou sinais de degradação, de rotura ou de dilatação quando implantado

como um enxerto de interposição na artéria femoral de um modelo animal. Por outro lado, funcionalmente a taxa de permeabilidade foi de apenas 50% aos 7 dias(L'Heureux et al., 1998). No que diz respeito a ultraestrutura observou-se uma ausência de fibras de elastina que tornam estes vasos menos complacentes do que os vasos nativos e as fibras da matriz extracelular não exibiam uma organização circular que conferem a artéria as propriedades mecânicas características. Neste enxerto, endotélio expressava o factor de *von Willebrand*, produzia prostaciclina e inibia adesão plaquetária *in vitro* (L'Heureux et al., 1998). Em estudos subsequentes foi também demonstrado que estes vasos são fisiologicamente activos respondendo a substâncias vasoactivas como a histamina, as cininas e ATP(L'Heureux et al., 2001). Após esta primeira tentativa, o processo de fabrico foi aperfeiçoado de modo a formar a camada média e adventícia apenas numa etapa reduzindo o tempo de fabrico do vaso(Schutte & Nerem, 2013). A complacência foi melhorada (algures entre a complacência de uma artéria e veia)(Konig et al., 2009) através da síntese de fibras de elastina e funcionalmente as taxas de permeabilidade melhoraram (L'Heureux et al., 2006). Recentemente, este processo de fabrico de VSET produziu enxertos vasculares totalmente autólogos (Cytograft® Tissue Engineering) para a criação de fístulas arteriovenosas de acesso a hemodiálise encontrando-se na fase de estudo clínicos. Neste enxerto conseguiu-se uma integração nos vasos receptores e uma taxa de permeabilidade de 60%, 6 meses após implantação apesar de haver formação de aneurismas em alguns casos (McAllister et al., 2009; L'Heureux, McAllister, & de la Fuente, 2007). O processo de fabrico destes vasos é demasiado longo, estando descrito na bibliografia que pode demorar entre 6 e 9 meses(L'Heureux et al., 2006). A falta de disponibilidade *off the shelf* pode limitar a população de pacientes que podem beneficiar dos vasos fabricados através deste método. Muito recentemente foi publicado o fabrico de alloenxertos vasculares totalmente biológicos por este método de ET, na tentativa de ultrapassar esta limitação. Os alloenxertos foram armazenados durante 9 meses sem alteração das propriedades mecânicas e foram posteriormente usados num ensaio clínico para acesso vascular de hemodiálise mantendo-se completamente funcionais ao fim de 11 meses de utilização(Wystrychowski et al., 2013)

9.3. Origem das células para ET.

A origem das células utilizadas em ET (Tabela 2) de vasos é um factor decisivo no sucesso da biointegração dos enxertos vasculares construídos por este conjunto de técnicas. Apesar de haver algum debate sobre a necessidade da utilização de células

autólogas de músculo liso para a formação da camada média dos vasos obtidos por ET é consensual que o uso de células endoteliais autólogas é necessário quando se quer criar um vasos por ET (Schutte & Nerem, 2013). Nos enxertos acelulares, as células endoteliais autólogas migram dos vasos contíguos até a uma distância máxima de 1 a 2 cm na superfície luminal deixando uma porção média exposta a trombose vascular. A criação de um endotélio funcional na superfície dos vasos obtidos por ET é um factor crítico para a sua performance funcional. A endotelização *in vitro* passa por obter células endoteliais ou células com capacidade para se diferenciarem em células endoteliais e semeá-las nos VSET. Para a obtenção das células endoteliais podemos recorrer a várias origens como se pode observar a partir da tabela. Além das células endoteliais são necessárias também grandes quantidades de células musculares lisas (CML) para a formação de um vaso por ET. No entanto, a cultura *in vitro* de CML pode resultar numa modulação para um fenótipo mais sintético onde as células perdem a capacidade de contracção e a capacidade de síntese de elastina (Opitz et al., 2004). Esta situação pode ser revertida para um fenótipo mais próximo do nativo através da estimulação mecânica em bioreactores, onde tensão cíclica aumenta a resistência mecânica do VSET e promove um fenótipo celular mais contráctil. A estimulação mecânica como forma de modulação é ainda uma área onde o conhecimento é escasso desconhecendo-se ainda os protocolos ideais para obter os melhores resultados. Os fibroblastos nem sempre são usados na criação de VSET. A sua utilização cria uma camada adventícia e podem igualmente substituir a CML porque apresentam um aparelho contráctil. A camada adventícia cria uma resistência mecânica extra para o (L'Heureux, et al., 1993) VSET. A par de células endoteliais autólogas, as células estaminais mesenquimatosas são um recurso frequentemente utilizado em ET devido à facilidade e disponibilidade que existe na sua colheita.

Tabela 2 – Potenciais origens de células endoteliais usadas em Engenharia de Tecidos (adaptado de (Nerem & Ensley, 2004)).

Origem de células endoteliais	Vantagens e desvantagens
Células endoteliais autólogas (obtidas por biópsia)	Requerem uma expansão <i>in vitro</i> Não disponíveis <i>off-the shelf</i>
Células endoteliais homólogas	Requerem uma estratégia de imunooceitação Possibilidade de utilização off-the-shelf
Células modificadas geneticamente	Possibilidade de utilização off-the-shelf Necessitam de modificação genética para lhe conferir função celular endotelial.
Células estaminais mesenquimatosas ou células progenitoras adultas	Células autólogas ou imunoprivilegiadas Possibilidade de transformação em célula endotelial

Adicionalmente, estas células demonstraram *in vitro* a capacidade de expressar marcadores fenotípicos de CML (Gong & Niklason, 2011) em determinadas condições de cultura que estimulam essa expressão (tensão cíclica, factores de crescimento e proteínas da matriz extracelular). Foi também demonstrado *in vivo* que as células estaminais mesenquimatosas combinadas com células progenitoras endoteliais em remendos de artérias pulmonares conseguem manter estes dispositivos cardiovasculares funcionais a longo prazo (Mettler et al., 2008). A capacidade de transformação das células estaminais mesenquimatosas em células endoteliais (Shojaei, et al., 2013) foi extensamente estudada, demonstrando-se que nas condições certas de cultura foi possível a transformação, aumentando o potencial de utilização destas células na produção de VSET. A modificação genética de células estaminais mesenquimatosas com o objectivo de produzir óxido nítrico de forma semelhante as células endoteliais (Zhang, et al., 2006). Em conclusão as células estaminais mesenquimatosas são imunoprivilegiadas não havendo problemas de rejeição e apresentam as propriedades

funcionais necessárias o que tornam este sistema celular uma alternativa credível as origens celulares alogénicas para produção de VSET *of-the-shelf*.

9.4. Matrizes de polímeros biodegradáveis, hidrogéis ou biopolímeros.

9.4.1. Matrizes de polímeros biodegradáveis.

Vários polímeros sintéticos biodegradáveis foram investigados para aplicação em ET de vasos sanguíneos (Tabela 3). O conceito básico em todas estas abordagens consiste em depositar células em um polímero biodegradável que suporta crescimento e remodelação tecidual. Porque as condições utilizadas para fabricar os polímeros são demasiado agressivas para as células sobreviverem, as células não podem ser incorporadas directamente durante o fabrico do polímero. A celularização é realizada posteriormente baseando-se em técnicas que promovem a invasão ou a incorporação de células no polímero (Villalona et al., 2010), o que pode levar a uma distribuição não uniforme das células no polímero. Idealmente, o polímero será reabsorvido lentamente em cultura ou após a implantação, deixando apenas o tecido gerado pelas células. As características intrínsecas destes polímeros são vantajosas porque a sua microestrutura, propriedades mecânicas, e as taxas de reabsorção podem ser cuidadosamente controladas através da modificação da composição química, numa tentativa de estimular o crescimento e a remodelação do tecidual. Além disso, estes polímeros podem fornecer um suporte mecânico inicial para o enxerto *in vitro* e/ou *in vivo* até que as células tenham a oportunidade de sintetizar quantidades significativas de MEC. No entanto, desintegração precoce é um grande risco, porque a falha das células em produzir MEC em quantidades significativas antes do polímero se degradar pode ser catastrófico em VSET. O polímero biodegradável mais extensamente utilizado para ET é o ácido poliglicólico (PGA) (Niklason et al., 1999), porque é rapidamente absorvido é necessário que seja realizada uma cultura celular *in vitro* antes da implantação. Numa tentativa de melhorar as propriedades mecânicas e regular o fenótipo celular através de interações com o biomaterial, numerosos outros polímeros foram copolimerizados com o PGA, nomeadamente: o ácido poli-L-lactico (PLA) (Mooney et al., 1996), o polihidroxialcanoato (PHA) (Shum-Tim et al., 1999), o poli-4-hidroxibutirato (Mendelson et al., 2007), o ácido policaprolactona-co-polilactico (PLLA) (Watanabe et al., 2001) e o poliglicoetileno (PEG) (Wake, Gupta, & Mikos, 1996). Existem para além destes polímeros, muitos outros que

foram testados isoladamente ou em combinação para aplicações vasculares de ET. A tabela apresenta uma lista de vários polímeros e co-polímeros que atingiram a fase pré-clínica e clínica do seu desenvolvimento. Até ao presente, apenas um único copolímero biodegradável semeado com células autólogas chegou à fase de ensaios clínicos.

Tabela 3 – Enxertos vasculares fabricados com polímeros biodegradáveis testados *in vivo* (adaptado de Schutte & Nerem, 2013).

Polímero	Aplicação do polímero	Referência bibliográfica
Testado <i>in vivo</i> ensaios pré-clínicos		
PGA	Enxerto vascular colocado num modelo suíno	(Niklason et al., 1999)
PGA-poliglactina	Enxerto vascular implantado numa artéria pulmonar ovina	(Shinoka et al., 1998)
PGA-PHA	Enxerto vascular de interposição colocado na aorta de ovelha	(Shum-Tim et al., 1999)
PGA - polihidroxibutirato	Remendo semeado com células estaminais mesenquimatosas colocado na artéria pulmonar de um ovino	(Mettler et al., 2008)
PGA - policaprolactona	Enxerto vascular de interposição colocado na aorta de rato	(Pektok et al., 2008)
PLA revestido com PLLA	Enxerto vascular de interposição colocado na aorta de rato	(Mirensky et al., 2009)
Testado <i>in vivo</i> ensaios clínicos		
PGA ou PLA revestidos com PLLA	Colocação de enxerto vascular cavopulmonar em 23 pacientes sem registo de complicações	(Shinoka & Breuer, 2008)

Nesta situação foi utilizado um copolímero de PGA e PLA semeado com células autólogas colhidas de uma veia periférica, construindo-se um enxerto por ET que foi aplicado com sucesso para reparar uma artéria pulmonar ocluída num paciente de 4 anos de idade (Shin'oka et al., 2001). No seguimento do desenvolvimento deste VSET foram construídas matrizes híbridas de PGA ou PLA revestidas com uma malha de um

copolímero de ϵ -caprolactona e L-láctico semeadas com células autólogas colhidas da medula óssea para implantação como um enxerto vascular biodegradável entre a artéria pulmonar e a veia cava superior (Shinoka & Breuer, 2008). Os resultados clínicos da implantação de 23 destes dispositivos demonstraram uma elevada taxa de permeabilidade, registando-se apenas um caso de estenose durante um período de 6 anos. Adicionalmente observou-se uma completa reabsorção do polímero e a sua substituição por neovaso autólogo funcional (Shinoka & Breuer, 2008).

9.4.2. Matrizes de biopolímeros e hidrogéis.

O trabalho pioneiro de Weinberg and Bell (Weinberg & Bell, 1986) motivou o desenvolvimento de um enxerto vascular completamente biológico. O conceito de artéria bioartificial (L'Heureux et al., 1993) inclui a formação de um tubo de um biopolímero abundante (o colagénio tipo I ou a fibrina) no organismo compactado com células musculares lisas (CML), onde na superfície luminal são semeadas células endoteliais autólogas. Ambos os biopolímeros, permitem o acolhimento de células durante a fibrillogénese também conhecido como gelificação tal como ocorre em condições fisiológicas. Como sugerido por L'Heureux é possível condicionar o alinhamento das fibrilhas e das CML aplicando uma restrição mecânica causando compactação. Esta força de compactação produz um alinhamento de circunferencial das fibrilhas e das células comparáveis ao encontrado nas artérias nativas (Barocas, Gorton, & Tranquillo, 1998). Para a produção da artéria bioartificial, uma solução de monómeros de colagénio com CML é injectada num bioreactor onde é comprimida em torno de um mandril ou molde tubular. O gel de colagénio semeado com CML comprimido em torno de um mandril não aderente (*Teflon*) é sujeito a forças de tracção para formar uma construção equivalente à média que pode ser subsequentemente endotelizada para formar a artéria bioartificial. No entanto, o alinhamento circunferencial das fibras não conseguiu produzir um vaso bioartificial com uma força mecânica para suportar uma pressão arterial fisiológica (Hirai & Matsuda, 1995). Devido à facilidade de fabrico foram criados hidrogéis usando fibrina (Grassl, Oegema, & Tranquillo, 2003) ou uma mistura de fibrina e colagénio (Rowe, Lee, & Stegemann, 2007; Rowe & Stegemann, 2006) resultando numa melhoria da resistência mecânica da construção e no aumento da produção de colagénio pelas CML e fibroblastos encapsulados neste hidrogel ao contrário do que acontece no hidrogel de colagénio (Clark, et al., 1995). Apesar do tecido vascular baseado na fibrina apresentar

propriedades mecânicas superiores é necessário a incorporação de ácido ϵ -aminocaproico para prevenir a degradação proteolítica, para melhorar a compactação e a resistência deste hidrogel(Rowe et al., 2007). Devido à falta de capacidade dos hidrogéis para suportarem a pressão arterial diversas estratégias foram adoptadas para melhorar as suas propriedades mecânicas. A incorporação de membranas de *Dacron* na construção do hidrogel(Weinberg & Bell, 1986) e a reticulação através de agentes não citotóxicos(Orban et al., 2004) foram usadas para melhorar a resistência mecânica dos hidrogéis.

10. Modelos experimentais e métodos de pesquisa em cirurgia vascular.

Os modelos animais que utilizam grandes animais domésticos têm sido utilizados para a avaliação funcional de dispositivos cardiovasculares e respectivos biomateriais, porque apresentam uma maior semelhança com a anatomia e fisiologia ao contrário do que ocorre com outros modelos experimentais que utilizam animais de pequeno porte como ratos e coelhos. Classicamente, os modelos experimentais em cirurgia vascular utilizavam grandes animais de espécies como o babuíno, a ovelha, o porco e o cão. Estas espécies apresentam grandes vasos com um calibre que permitem a implantação vascular de próteses vasculares de 3 a 6 mm de ID podendo chegar-se até a implantar-se próteses com um calibre de 8 mm na aorta abdominal.(Byrom, et al., 2010).

Os modelos animais são extremamente úteis na avaliação pré-clínica dos biomateriais e respectivos dispositivos cardiovasculares e são a última etapa da investigação antes dos estudos clínicos em humanos. O objectivo dos ensaios pré-clínicos das próteses vasculares é avaliar as características da prótese que são difíceis senão impossíveis de conseguir utilizando os testes *in vitro*. A capacidade da prótese manter a sua permeabilidade, a biocompatibilidade da prótese e as características de manuseamento (ex: facilidade de sutura) são aspectos que são apenas possíveis de avaliar nos ensaios pré-clínicos *in vivo*. Os ensaios pré-clínicos podem ser de curta duração (menos de 20 semanas) ou de longa duração(Bianco et al., 2013a). Os critérios internacionalmente aceites para testagem *in vivo* de próteses vasculares estão reunidos em normas. Sendo as normas ISO as mais consensualmente aceites pela comunidade científica. Estas normas conferem linhas orientadoras para os ensaios *in vivo*. Destas linhas orientadoras destacam-se a necessidade de utilizar pelo menos 6 animais em ensaios não inferiores a

20 semanas e a obrigatoriedade de utilização de um grupo controlo onde se implanta um biomaterial de referência (ISO, 1994). A permeabilidade das próteses dever ser avaliada utilizando angiografia ou ecografia em modo *Doppler* (Figura 7), (ISO, 1994). Posteriormente deve haver um estudo patológico das próteses explantadas (ISO, 1994).

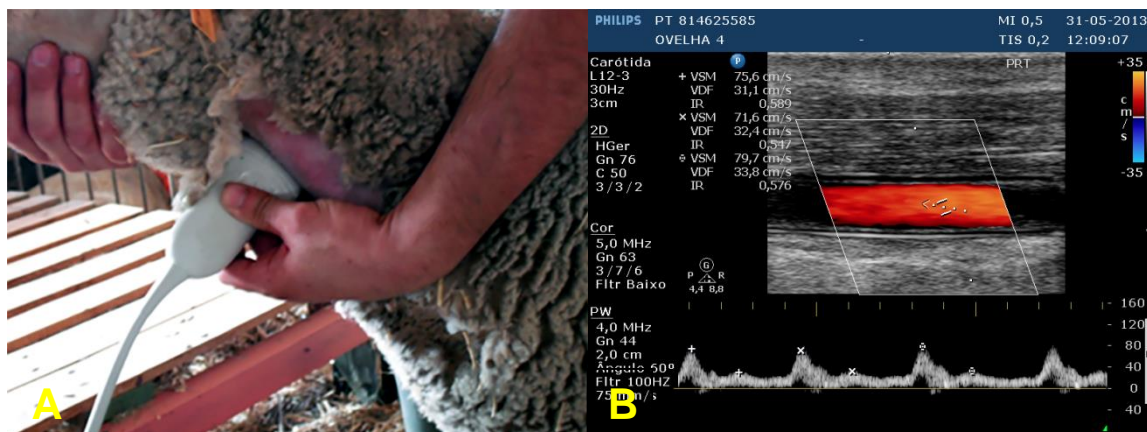


Figura 7 – (A) Monitorização funcional da prótese vascular de PVA/Dx em ovelha, (B) aspecto de ecografia modo Doppler da prótese de PVA/Dx implantada na artéria carótida comum.

O porco e o cão foram inicialmente muito utilizados em investigação relacionada com a cirurgia vascular devido a vários factores anatómicos e fisiológicos. Nomeadamente, o porco apresenta uma circulação coronária semelhante ao homem o que faz deste animal um modelo ideal para estudar a lesões de isquémia/reperfusão do miocárdio e a colocação de diversos modelos de *stents* coronários (Bianco et al., 2013b). No entanto, apesar da morfologia arterial ser semelhante ao homem, a sua utilização para testagem *in vivo* de próteses vasculares tem sido abandonada pela menor dimensão dos vasos e pela maior fragilidade dos mesmos. Adicionalmente são animais difíceis de manterem devido à sua agressividade e ao facto de atingirem aos 6 meses pesos na ordem dos 80-100 Kg (Bianco et al., 2013b). Devido aos factos referidos anteriormente, o porco tem vindo a ser substituído pela ovelha como modelo de testagem de próteses vasculares.

Historicamente, o cão foi muito utilizado como modelo experimental em cirurgia vascular. O cão é um animal geralmente familiarizado com os seres humanos, tornando-os fáceis de manusear, adicionalmente a sua manutenção é fácil e barata. A fisiologia cardiovascular é semelhante à dos seres humanos, e possuem uma baixa quantidade de gordura corporal o que torna o acesso vascular relativamente simples. As artérias periféricas neste animal estão disponíveis em diâmetros de 3 a 5 mm, e a aorta pode

acomodar enxertos vasculares de interposição até 8 mm de diâmetro (Bianco et al., 2013b). Os cães também são tolerantes a anestesia prolongada. O cão enquanto modelo para testagem de próteses vasculares tem apresentando desvantagens do ponto de vista anatômico e fisiológico que tem levado a sua substituição pela ovelha. Nomeadamente, ao nível das propriedades visco-elásticas dos vasos, as artérias são mais elásticas do que no homem e não demonstram o aumento da rigidez da parede que se verifica no homem com o avançar da idade. É também observada uma grande variabilidade entre indivíduos no que concerne a interacção das plaquetas com os biomateriais (Jones et al., 1991). Relativamente ao seu sistema de coagulação verificou-se que este se apresenta fisiologicamente mais afastado dos mecanismos de coagulação do homem, relativamente a outros modelos animais (ovelha e porco)(Byrom et al., 2010). Também os motivos éticos relacionados pela forma diferente com que o cão é visto na sociedade levaram a que o cão fosse progressivamente substituído por outros modelos experimentais.

O babuíno é o modelo animal que filogeneticamente mais se aproxima do homem e por essa razão é o animal mais utilizado para estudos de hemocompatibilidade de superfícies. Este modelo animal é utilizado especificamente para estudos de avaliação de endotelização de próteses vasculares colocadas nas artérias ilíacas e aorta(Clowes et al., 1985; Clowes, Kirkman, & Clowes, 1986) e também para os estudos de trombogenicidade aguda através de estudo de imagem das plaquetas radiomarcadas que aderem á superfície(Christenson et al., 1983). O babuíno tal como outras modelos animais de grande porte (ovelha, porco e cão) foi utilizado para estudar a patogénese da hiperplasia da íntima (Sarkar, et al., 2006).

A ovelha é um dos modelos animais mais amplamente utilizados para a avaliação de dispositivos cardiovasculares e serviu durante décadas como modelo experimental padrão para a investigação utilizando válvulas cardíacas bioartificiais. A ovelha enquanto modelo experimental apresenta numerosas vantagens que incluem um baixo custo de manutenção, a facilidade no manuseamento do animal, apresenta um tamanho adequado e estável ao contrário do suíno bem como vasos periféricos (artéria carótida e femoral) com 4 a 6 mm de ID que podem ser facilmente utilizados para implantação e monitorização funcional de próteses artificiais. A terapêutica de anticoagulação utilizada na ovelha sujeita a cirurgia vascular segue protocolos idênticos aos utilizados em medicina humana. A ovelha pode ser anticoagulada com warfarina e heparin(Park et al., 2003; Connell et al., 2007). No entanto são utilizadas doses mais elevadas devido ao

efeito diluidor que o rúmen exerce sobre os fármacos administrados *per os*. Nesta espécie a resposta ao clopidogrel(Connell et al., 2007) é modesta e a aspirina só eficaz em inibir a agregação plaquetária se administrada por via endovenosa(Soldani et al., 2010).

Hematologicamente, as ovelhas apresentam um sistema de coagulação mais próximo do homem do que o próprio suíno. No entanto há uma tendência para a hipercoagulabilidade nos ovinos relativamente aos humanos. Existem igualmente diferenças, nomeadamente as ovelhas apresentam uma concentração superior de plaquetas por unidade de volume de sangue quando comparadas com outras espécies utilizadas em experimentação animal (ex: suíno) e a capacidade de adesão destes elementos celulares é superior na ovelha(Tillman, Carson, & Talken, 1981). O sistema fibrinolítico da ovelha é também menos eficaz do que nas restantes espécies(Karges, Funk, & Ronneberger, 1994). Todos estes factores conjugados conferem uma tendência para a hipercoagulabilidade neste modelo animal. Em relação aos outros elementos celulares, os eritrócitos de ovelha são de menores dimensões relativamente aos humanos e a outros modelos animais(Weiss & Wardrop, 2011). Adicionalmente a sua taxa de sedimentação é igualmente inferior devido a ausência de formação de *rouleaux* nos ovinos. Outra particularidade dos eritrócitos de ovinos é que são osmoticamente mais frágeis do que os correspondentes humanos. Em ovinos, a hemólise inicia-se quando em contacto com soro fisiológico a 0,65% e é total quando contacta com soro fisiológico a 0,40%(Didisheim, 1985)

O modelo experimental de interposição de próteses vasculares na artéria carótida em ovinos (Figura 8) apresenta vantagens em relação a outras localizações. A artéria carótida nos ovinos apresenta um diâmetro similar ao dos vasos periféricos em humanos. A localização cervical desta artéria é vantajosa porque é bem tolerada pelo animal e a monitorização funcional da prótese é igualmente fácil devido á posição superficial deste vaso (Soldani et al., 2010; Sardelic, et al., 1994).

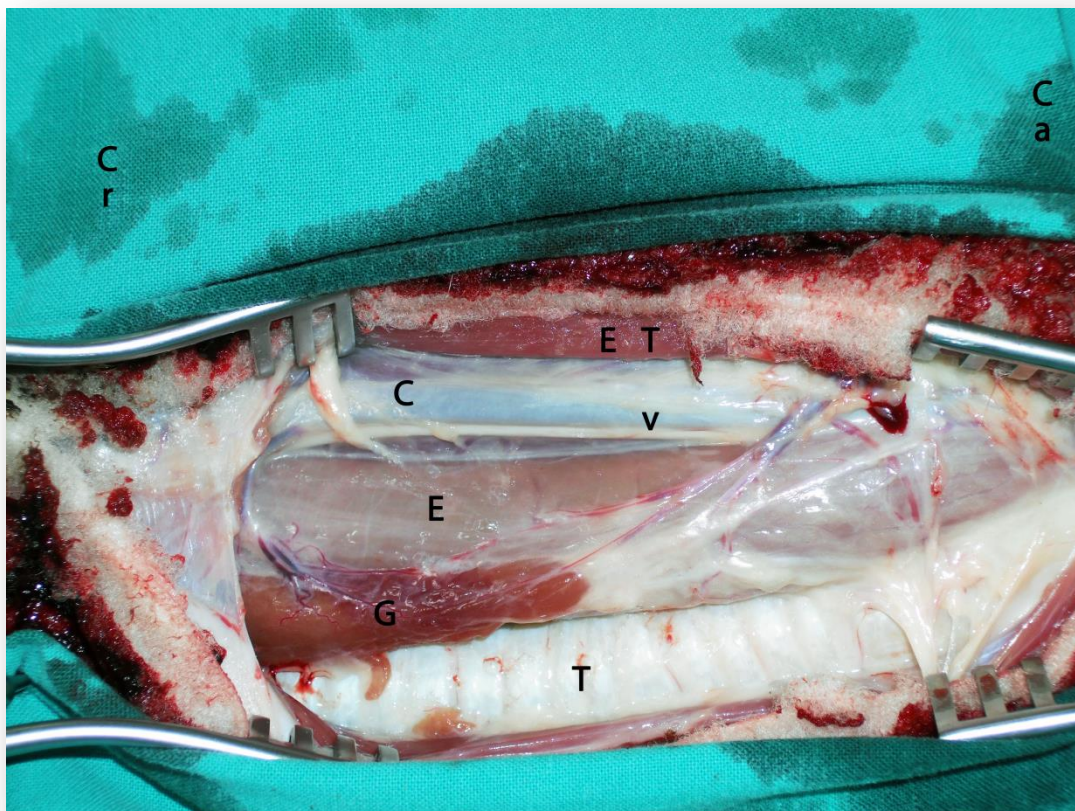


Figura 8 - Aspecto das estruturas anatômicas identificadas no acesso cirúrgico à artéria carótida comum esquerda (C-carótida, Ca – caudal, Cr - cranial, E-esôfago, ET-musculo esterno-cefálico, G-glândula tiróide, T-traqueia, V-nervo vago).

Além do mais se ocorrer uma oclusão bilateral das artérias carótidas comuns como complicação da implantação de uma prótese raramente surgem sinais neurológicos devido á particular circulação cerebral da ovelha. Ao contrário da maioria das outras espécies utilizadas em cirurgia experimental, a artéria basilar na ovelha apresenta apenas ligações ténues com as artérias vertebrais que em vez disso comunicam com a porção mais cranial das artérias carótidas comuns por uma anastomose occipitovertebral bem desenvolvida(Baldwin & Bell, 1963b). A partir daqui, o sangue flui cranialmente através da artéria carótida comum externa em cada lado para, eventualmente, atingir o círculo de *Willis*. O sangue de cada a artéria carótida comum é distribuído unilateralmente pela respectiva área encefálica(Baldwin & Bell, 1963a). A oclusão de uma artéria carótida comum resulta distribuição sanguínea bilateral devido ao fluxo que ocorrer através das anastomoses disponíveis. A oclusão de uma ou ambas as artérias carótidas comuns provoca aumentos de fluxo e pressão na restante artéria carótida comum ou artérias

vertebrais, ou nestas duas estruturas anatómicas(Baldwin & Bell, 1963c; Baldwin & Bell, 1963d). O fluxo da artéria carótida é muito superior (325 ± 108 vs 160 ± 70 mL/min) ao fluxo da artéria femoral apesar de apresentarem um diâmetro semelhante(Dunn et al., 1996). Foi também evidenciado que quando se implanta uma prótese na artéria carótida, a redução do fluxo que decorre deste procedimento é superior a que ocorre na artéria femoral, provavelmente devido a maior intensidade do vasoespasma que ocorre numa artéria muscular como a carótida (Dunn et al., 1996). Adicionalmente, também poderá ocorrer uma maior discordância nos diâmetros quando se aplicam próteses de diâmetro muito reduzido (4 mm) na artéria carótida resultando numa maior redução de fluxo (Dunn et al., 1996). O grau de redução no fluxo que ocorre na artéria carótida tem influência no grau de deposição de fibrinogénio e plaquetas o que pode influenciar negativamente taxa de permeabilidade (Lundell, Bergqvist, & Lindblad, 1993). Por essa razão para este modelo experimental ser válido o fluxo deve ser o mais próximo possível dos valores fisiológicos.

A ovelha para além de ser utilizada como modelo experimental para avaliação da trombogenicidade aguda e da taxa de permeabilidade de próteses sintéticas. É também utilizada frequentemente como modelo de desenvolvimento de hiperplasia da íntima através da interposição de próteses vasculares na artéria carótida (Taylor, Fletcher, & Ao, 1996) ou da colocação de remendos(Hawthorne, et al., 2002) de diferentes polímeros sintéticos na artéria carótida por uma técnica de arteriotomia. Uma outra forma de avaliar o desenvolvimento da íntima foi conseguida pela criação de fístula arteriovenosa entre artéria carótida e a veia jugular externa utilizando próteses de diferentes biomateriais. Pretende-se com este modelo (Kohler & Kirkman, 1999) avaliar a hiperplasia da íntima que ocorre rapidamente (em 4 semanas) na porção venosa da fístula de acesso vascular em hemodiálise.

A artéria femoral apesar de ter um diâmetro inferior a artéria carótida foi utilizada com sucesso como modelo de avaliação de trombogenicidade aguda (Nazzal, Owunwanne, & Christenson, 1991) e das taxas de permeabilidade(Christenson, et al., 1991). Esta artéria foi também utilizada como modelo experimental, com objectivo avaliar o efeito dos *cuffs* venosos(Cabrera Fischer et al., 2005) na redução da hiperplasia da íntima na anastomose arteriovenosa que se realizam nas revascularizações femorais. Existem dificuldades inerentes à utilização do modelo da artéria femoral tais como: maior dificuldade no acesso cirúrgico ao vaso pela presença de maiores massas musculares no

local e maior dificuldade de realização de anastomoses com próteses com diâmetro superior a 5 mm (Byrom et al., 2010).

11. Polivinil álcool hidrogel.

O polivinil álcool hidrogel (PVA) é um polímero sintético com grupos pendentes - OH. É formado através da hidrólise de grupos de acetato de polivinil acetato que por sua vez é polimerizado a partir de monómeros de acetato de vinil. As principais características que definem o comportamento do PVA são o grau de hidrólise e o grau de polimerização. Ele pode ser utilizado para formar películas, membranas, espumas e hidrogéis na área de engenharia de tecidos, mas também tem várias outras funções, como surfactante ou selante. É solúvel em água sendo a solubilidade dependente do seu peso molecular (Hassan & Peppas, 2000). O PVA pode formar hidrogéis com elevado teor de água através de diferentes métodos de reticulação: na **reticulação química** utilizam-se agentes químicos como glutaraldeído, formolaldeído, acetaldeído e outros monoaldeídos; a **reticulação física** dá-se por ciclos de congelamento/descongelamento, irradiação γ e por fotopolimerização (Hassan & Peppas, 2000).

Os hidrogéis de PVA apresentam propriedades mecânicas, ópticas e um elevado grau de dilatação na água que os tornam adequados para a engenharia de tecidos (Mangiapia et al., 2007). Apesar de terem a capacidade de reter água, os hidrogéis permanecem insolúveis devido à reticulação física. O método de congelamento /descongelamento tem uma vantagem importante sobre os métodos químicos de reticulação. Devido à sua natureza puramente física não há risco de libertação dos produtos químicos remanescentes que possam comprometer a biocompatibilidade do hidrogel final. Além disso, os géis formados com este método são altamente elásticos e duráveis, propriedades importantes para o seu uso em engenharia de tecidos. Contudo as propriedades mecânicas dos hidrogéis formados por reticulação física dependem do peso molecular do polímero, da concentração da solução, da temperatura de congelamento e descongelamento e do número de ciclos de congelamento/ descongelamento.

No entanto, os hidrogéis de PVA obtidos por reticulação física apresentam algumas desvantagens, como a necessidade de esterilização, o que não é necessário no caso de hidrogéis reticulados por irradiação γ que estão inerentemente estéreis (Hassan & Peppas, 2000). Além disso, na presença dos aditivos macromoleculares naturais, tais

como o quitosano, o dextrano e a celulose bacteriana, o processo de gelificação é diferente porque geralmente esses aditivos não são tão propensos a gelificação como as cadeias de PVA(Liu, et al., 2009a). Isto faz com que a heterogeneidade da estrutura e também a perda rápida dos aditivos que o núcleo de PVA(Mathews, et al., 2008). O PVA tem mostrado ser biocompatível, provocando uma resposta inflamatória mínima após a implantação (Stammen, et al., 2001) como demonstrado pela avaliação de biocompatibilidade realizada no presente trabalho.

10.1. Aplicações biomédicas do PVA.

Devido às suas propriedades mecânicas e excelente biocompatibilidade, os hidrogéis de PVA tem diversas aplicações na indústria biomédica e farmacêutica. No que diz respeito as aplicações biomédicas, os hidrogéis foram utilizadas no fabrico de lentes de contacto (Hyon et al., 1994) e também como matriz de material de pensos (Gonzalez, et al., 2014; Kokabi, Sirousazar, & Hassan, 2007; Liu, et al., 2009b). A capacidade do hidrogel de PVA em reter água a par das suas propriedades viscoelásticas torna este biomaterial semelhante a estruturas anatómicas como o disco intervertebral e o menisco. Aproveitando estas características intrínsecas o PVA foi testado em condições experimentais para a síntese do núcleo polposo de disco intervertebrais prostéticos (Thomas, et al., 2004; Joshi et al., 2006) e meniscos (Kobayashi, Toguchida, & Oka, 2001). No que se refere a aplicações no sistema músculo-esquelético, devido as suas propriedades hidrofílicas e elevada biocompatibilidade foi utilizado para envolver *tenodesis* de tendões com o objectivo de reduzir as adesões aos tecidos envolventes (Kobayashi, Chang, & Oka, 2005). Outra das aplicações musculo-esqueléticas do PVA prende-se com o seu uso como matriz para a biosíntese de cartilagem(Qu et al., 2011) ou até para substituir defeitos condrais *in situ* (Sciarretta, 2013). A utilização do PVA como matriz para a manutenção de condrócitos foi também explorada para o fabrico de próteses de septo nasal(Bichara et al., 2010; Bichara DA et al., 2011) Como já referido anteriormente, o PVA é um biomaterial inerte para os tecidos que o envolvem sendo considerado por diversos autores como não irritante(Lamponi et al., 2012; Wang et al., 2008; de Souza Costa-Júnior, Pereira, & Mansur, 2009; Burczak, Gamian, & Kochman, 1996; Elakkiya, et al., 2013), desta forma este hidrogel foi igualmente testado *in vitro* como substituto do humor vítreo (Lamponi et al., 2012). No que concerne a aplicações experimentais para o sistema cardiovascular pelas suas propriedades viscoelásticas muito semelhantes á matriz extracelular dos tecidos moles foi testada para a produção de

válvulas cardíacas (Wan, et al., 2002) e próteses vasculares (Chaouat et al., 2008). As aplicações farmacêuticas do hidrogel de PVA tem-se concentrado no desenvolvimento de dispositivos de libertação lenta de fármacos tirando partido elevada biocompatibilidade do hidrogel que estimula uma fraca reacção de corpo estranho permitindo esta função (Guowei, et al., 2007; Marcilli & de Oliveira,). Apesar de existir um grande número de aplicações, os dispositivos médicos fabricados com PVA isoladamente ou em co-polimerização ainda não atingiram a fase comercial do seu desenvolvimento.

11. Dextrano.

O dextrano é um polissacarídeo sintetizado a partir da sacarose durante o crescimento das bactérias pertencentes ao género *Lactobacillus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus mutans* e *Pediococcus pentosaceus* (Patel, et al., 2010). Este é um polímero altamente solúvel em água, não tóxico, biodegradável e biocompatível. Está comercialmente disponível em diferentes pesos moleculares. No entanto, o dextrano utilizado preferencialmente em aplicações biomédicas tem baixo peso molecular (40000 a 70000g/mol), uma vez que tem um tempo de semi-vida mais curto do que o dextrano de elevado peso molecular. Este polímero possui um grande número de grupos hidroxilo que permitindo que sofra reticulação física e química.

11.1 Aplicações biomédicas do dextrano

O dextrano sendo um polímero biocompatível e biodegradável apresenta um grande potencial para a inclusão em diversos dispositivos biomédicos. O dextrano é utilizado há mais de 50 anos como expansor do volume plasmático (Bowman, 1953; Leonsins, 1952). Ao nível da coagulação apresenta múltiplos efeitos incluindo inibição da activação plaquetária (Zeerleder, et al., 2002), diminuição da polimerização da fibrina (Abir, Barkhordarian, & Sumpio, 2004), diminuição da viscosidade sanguínea (Burke, et al., 1979) e diminuição da formação de *rouleaux* eritrocitário (Neu, Wenby, & Meiselman, 2008) que pode ser usados como solução de perfusão em cirurgia reconstructiva e vascular para prevenir a formação de trombozes em anastomoses vasculares (Foster, et al., 1966). Outra das aplicações do dextrano diz respeito a sua utilização como matriz libertadora de fármacos, conjugando-se o composto com o dextrano através de diversas técnicas formando uma pró-droga que será regenerada exclusivamente através de uma hidrólise regulada pelo pH libertando o composto para os tecidos alvo. A incorporação na

matriz de material de pensos isoladamente(De Cicco et al., 2014) ou em co-polimerização (Unnithan et al., 2012) é a outra das potenciais aplicações do dextrano. A capacidade de reter água do dextrano criando um ambiente húmido propicia a regeneração da ferida. Adicionalmente, a capacidade de libertar fármacos de forma prolongada permite a incorporação de antibióticos em matrizes de dextrano incorporadas em pensos. Como adesivo tecidual, o dextrano foi combinado com uretanos e testado *in vitro* apresentando uma força de adesão superior a cola tecidual de fibrina (Wang, Nie, & Yang, 2012). Ao nível dos dispositivos cardiovasculares, o dextrano foi usado no revestimento de próteses vasculares com o objectivo de melhorar a hemocompatibilidade destes dispositivos diminuindo a adesão plaquetária(Nazzal et al., 1991) e estimulando a endotelização das superfícies das próteses(Derkaoui et al., 2010). Esta propriedade foi também observada por nós no decorrer deste trabalho. Apesar de existir um grande número de aplicações, poucas foram produzidas em larga escala em parte devido ao preço elevado do dextrano. A excepção é a utilização do dextrano como expansor do volume plasmático.

CAPITULO II

ESTADO DA ARTE E OBJECTIVOS DO ESTUDO

ESTADO DA ARTE

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade nos países desenvolvidos particularmente as que causam obstrução do fluxo como a aterosclerose (Go et al., 2013). A aterosclerose é uma doença arterial comum que se caracteriza pela formação de uma placa de aterosclerose na parede arterial que a longo prazo resulta em estenose e obstrução do fluxo sanguíneo (Abdulhannan et al., 2012). A falta de irrigação sanguínea pode resultar em isquemia do miocárdio, dos membros e do cérebro. A terapêutica corrente da aterosclerose inclui a cirurgia de *bypass* ou de revascularização, a colocação de *stents* intravasculares, a administração de anticoagulantes e alteração no estilo de vida (Hobson et al., 2008). A cirurgia de *bypass* ou de revascularização é um procedimento cirúrgico que utiliza um enxerto vascular artificial ou autólogo quando se recorre a uma veia ou artéria periférica do próprio paciente para restabelecer o fluxo sanguíneo num tecido isquémico (Hobson et al., 2008). As artérias e as veias autólogas são a primeira escolha para pacientes que necessitam de cirurgia arterial de *bypass*. Apesar das artéria e veias autólogas serem complacentes e não-trombogénicas, o seu uso está limitado a pacientes que apresentam tecido vascular periférico saudável tendo também a desvantagem de ser necessário recorrer a uma segunda cirurgia para obter o enxerto. No entanto, até 30% dos pacientes que necessitam de cirurgia de *bypass* não possui vasos sanguíneos autólogos adequados ou suficientes e nestes casos é necessário recorrer à utilização de uma prótese vascular artificial (Nomi et al., 2002).

O politereftalato de etileno (PET) e politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) são os biomateriais usados correntemente para o fabrico de próteses vasculares obtendo-se resultados satisfatórios quando usados para substituir ou contornar vasos sanguíneos de grande diâmetro. No entanto, o desempenho clínico destes biomateriais enquanto próteses de pequeno diâmetro (ID inferior a 6 mm) é inferior aos enxertos vasculares autólogos. As próteses de PET e ePTFE quando usadas para cirurgia de revascularização femuro-poplíteia, apresentaram respectivamente, uma taxa de permeabilidade de 36 % e 47% ao fim de 2 anos de implantação (Nomi et al., 2002). Apesar apresentarem taxas de permeabilidades semelhantes, o ePTFE obteve uma taxa de permeabilidade primária superior ao PET o que suporta o uso preferencial de ePTFE em pacientes com isquémia dos membros inferiores, em particular quando se realiza uma anastomose distal ao joelho onde é necessário um enxerto de menor diâmetro. Um

estudo retrospectivo de longo prazo (5 anos) comparou também o desempenho funcional de ePTFE e enxertos venosos para procedimentos de *bypass* concluindo que a taxa de permeabilidade foi claramente inferior para ePTFE (74% vs 39%)(Klinkert et al., 2004). Apesar de biologicamente inertes, as próteses vasculares artificiais são também susceptíveis a infecção(Antonios et al., 2006) estando registados valores de prevalência de infecção de 2,6%(Lorentzen et al., 1985).

Devido ao mau desempenho funcional dos biomateriais correntemente utilizados, foram desenvolvidas estratégias para reduzir os factores que influenciam uma baixa taxa de permeabilidade nomeadamente a formação aguda de trombos e a hiperplasia da íntima(Kannan, et al., 2005; Kakisis et al., 2005).

A endotelização da superfície luminal do enxerto utilizando células endoteliais autólogas tornou-se um procedimento de sucesso para melhorar a taxa de permeabilidade a longo prazo (7 anos) em enxertos vasculares artificiais(Meinhart et al., 1997). No final do período de estudo, a taxa de permeabilidade primária para as próteses endotelizadas foi de 73,8%, um valor semelhante ao obtido para os enxertos venosos autólogos. Apesar do sucesso clínico obtido com esta estratégia, são necessários vários dias para conseguir-se uma camada confluyente de células endoteliais o que impede a sua utilização em situações de emergência. Outra estratégia passa pelo revestimento da superfície luminal das próteses sintéticas com carbono conferindo-lhe uma carga eléctrica negativa que tem como efeito último a inibição da adesão plaquetária (Groegler et al., 2002). No entanto, na prática clínica os estudos de campo não conseguiram demonstrar uma superioridade funcional deste tipo de próteses(Kapfer et al., 2006). Existem também outras estratégias de funcionalização das superfícies das próteses que tem como objectivo adsorver compostos ou moléculas que mimetizem a função do endotélio evitando a trombose num curto prazo até que a endotelização se complete. Estas estratégias incluem o uso de heparina, de trombomodulina e a utilização de polímeros de revestimento que libertam lentamente o óxido de azoto (Jordan & Chaikof, 2007). Na década passada, as próteses de ePTFE impregnadas com heparina quando usadas clinicamente demonstraram uma acentuada melhoria no seu desempenho(Peeters, et al., 2006) registando valores de taxa de permeabilidade na ordem dos 70-80%.

Entre as desvantagens descritas, as próteses sintéticas são rígidas em relação às artérias hospedeiras. Esta discordância na complacência é o principal factor responsável

pelo fluxo turbulento que se gera na transição anastomose-artéria nativa e o factor iniciador de todos os eventos fisiopatológicos que levam a hiperplasia da íntima(Lee & Lee, 2010).

Por todos estes motivos a investigação nesta área seguiu uma nova estratégia. Focando-se na obtenção de um enxerto através de metodologias de engenharia de tecidos que seja idêntico em todos os sentidos aos vasos hospedeiros. O objectivo da engenharia de tecidos consiste na produção de um vaso sanguíneo artificial estável e funcional que não contém qualquer material sintético (Isenberg et al., 2006). Para conseguir este objectivo, diversos investigadores exploraram o uso de células autólogas de várias origens ou geneticamente modificadas combinadas com vários tipos de matrizes de origem biológica ou sintética para construir estruturas tubulares e sujeitá-las a estímulos mecânicos e químicos numa tentativa de desenvolver um enxerto vascular de baixo diâmetro apto para substituir segmentos de vasos com sucesso. Adicionalmente com a engenharia de tecidos pretende-se construir um enxerto vascular com propriedades viscoelásticas semelhantes aos vasos nativos para evitar os distúrbios no fluxo que podem conduzir a hiperplasia da íntima. Sucintamente existem três estratégias de aplicação de engenharia de tecidos: *in vitro*, *in vivo* e *in situ*. Na engenharia de tecidos *in vitro*, a abordagem tradicional consiste em construir um vaso funcional fora do corpo, utilizando células, matrizes e bioreactores(Isenberg et al., 2006). A abordagem de engenharia de tecidos *in vivo* consiste na construção de um enxerto vascular autólogo *in vivo* utilizando o ambiente tecidual do corpo (ex:na cavidade peritoneal ou sob a pele) como um bioreactor (Li et al., 2014). Na variante *in situ* da engenharia de tecido vascular, evita-se o extenso período de tempo em cultura *in vitro* e fabrica-se um enxerto vascular celular ou acelular que tem as propriedades essenciais de um enxerto vascular, aproveitando o potencial das células autólogas para regenerar o enxerto vascular *in vivo*. Nesta abordagem de engenharia de tecidos, utiliza-se uma matriz biodegradável (que pode estar semeada ou não com células autólogas) que vai sendo lentamente degradada e substituída pela estrutura do vaso nativo *in situ*(Li et al., 2014). Como esta abordagem não necessita de um período longo de cultivo como na abordagem *in vitro*, a produção pode fazer-se em grande escala -se e os enxertos estão disponíveis *off-the-shelf*, por estas razões acreditamos que será a tendência de futuro na produção de enxertos vasculares por engenharia de tecidos.

Em todas estas variantes da ET, existem dois aspectos que são críticos para o sucesso funcional do enxerto vascular fabricado por ET. Uma superfície não-trombogénica é

fundamental para a permeabilidade dos enxertos e pode ser conseguida semeando células estaminais na superfície luminal ou modificando quimicamente a superfície com inibidores da activação da coagulação(Li & Henry, 2011). Outro aspecto importante a ter em conta na produção de enxertos vasculares por esta abordagem está relacionado com a utilização de células endoteliais alogénicas ou heterólogas. É conhecido que as células são altamente imunogénicas estimulando a rejeição, devendo por isso utilizar-se idealmente células endoteliais autólogas para ET (Li et al., 2014). Adicionalmente, estes enxertos no médio prazo exibirão propriedades viscoelásticas semelhantes aos vasos nativos não havendo assim discordância de complacência e consequentemente não haverá hiperplasia da íntima (Li et al., 2014).

Apesar de teoricamente os enxertos vasculares de ET apresentarem óbvias vantagens a sua produção em larga escala e a sua aplicação generalizada na prática clínica ainda não foi conseguida. Estando descritas na bibliografia apenas três situações onde enxertos vasculares produzidos por ET foram aplicados na prática clínica, especificamente para a realização de fístulas arteriovenosas de acesso vascular a hemodiálise e como enxerto para recanalização do fluxo sanguíneo da artéria pulmonar para a veia cava inferior (McAllister et al., 2009; L'Heureux et al., 2007; Shinoka & Breuer, 2008).

Por todas estas razões consideramos que existem lacunas no desenvolvimento de enxertos vasculares sintéticos utilizando novos materiais biodegradáveis. Neste sentido desenvolvemos uma prótese vascular sintética constituída por um co-polímero de PVA e dextrano a que associamos um sistema celular para promoção da biointegração da prótese. Contudo, a demonstração da utilidade do PVA(Chaouat et al., 2008) na reconstrução de pequenos vasos é limitada e necessita de ser investigada nas vertentes experimentais *in vitro* e *in vivo*

O PVA é um polímero hidrofílico com uma estrutura altamente purificada de nanofibrilhas em rede. O PVA tem propriedades de alta resistência mecânica, elevado conteúdo em água e biocompatibilidade. A aparência e a textura do PVA são semelhantes ao tecido arterial natural apresentando também propriedades mecânicas semelhantes aos tecidos envolventes. Este biomaterial é hidrofílico, tendo também grande capacidade de adsorção proteica bem como a propriedade de suportar o crescimento celular no seu interior com potencial para constituir uma camada tecidular não-trombogénica. Este

biomaterial tem sido utilizado como substituto temporário de pele(Hiraizumi, et al., 1995), como matriz de cartilagem (Grant et al., 2006) e como dispositivo de libertação controlada de fármacos(Hassan & Peppas, 2000) entre outras aplicações já referidas anteriormente. O PVA apresenta propriedades de biocompatibilidade como uma reacção de corpo estranho negligenciável e tem também propriedades viscoelásticas como boa resistência a cargas cíclicas rápidas e resistência à compressão devido ao elevado teor em água(Elshazly, 2004). Todas estas propriedades mecânicas e de biocompatibilidade tornam o PVA um biomaterial com características ideais para utilização em enxertos vasculares cuja performance funcional e estrutural necessitou de ser investigada *in vitro* e *in vivo*(Elshazly, 2004).

Com o objectivo de melhorarmos as características de hemocompatibilidade e biocompatibilidade, co-polimerizamos o PVA com o polissacárido dextrano na tentativa de melhorar a performance funcional da prótese por nós fabricada. Este polissacárido é um polímero biocompatível e biodegradável que apresenta múltiplas acções fisiológicas ao nível da coagulação incluindo inibição da activação plaquetária(Zeerleder et al., 2002),diminuição da polimerização da fibrina(Abir et al., 2004), diminuição da viscosidade sanguínea(Burke et al., 1979) e diminuição da formação de rouleaux eritrocitário(Neu et al., 2008) podendo ser usado como solução de perfusão em cirurgia reconstructiva e vascular para prevenir a formação de trombozes em anastomoses vasculares(Foster et al., 1966) .

A associação de biomateriais a um sistema celular capaz de produzir localmente os factores tróficos potenciadores da regeneração da parede do vaso ou com capacidade de se diferenciar em células endoteliais (ou em outra camada do vaso) tem sido uma linha experimental seguida em outras áreas da regeneração de tecidos nomeadamente na neuroregeneração (Amado et al., 2008; Luis et al., 2008b; Luis et al., 2008a). As potencialidades das células estaminais devem por isso ser estudadas e testadas em associação com os enxertos vasculares de PVA.

O tecido embrionário gelatinoso (geleia de *Wharton*) do cordão umbilical (CU), localizado entre o epitélio amniótico e os vasos umbilicais, o qual tem como principal função a protecção dos vasos e o impedimento do seu colapso, é uma fonte rica em células estaminais multipotentes e uma pequena percentagem de células estaminais pluripotentes e que podem ser utilizadas em variadas terapias. O material matricial do

cordão deriva do mesênquima primitivo que é encontrado no estado de transição para o mesênquima encontrado na medula adulta(Weiss et al., 2008).

Dois tipos de células têm sido encontrados no cordão umbilical: células estaminais hematopoiéticas e mesenquimatosas. As células provenientes do cordão têm merecido muita atenção devido a vários factores: 1) o CU tem mais células primitivas por unidade de volume do que a medula óssea; 2) a taxa de rejeição de tais células é menor; 3) não é necessária compatibilidade antigénica ao contrário da medula óssea; contrariamente à da medula óssea, não necessitam compatibilidade antigénica e 4) são mais fáceis de obter, processar e armazenar(Bax, McKenzie, Bilek, & Weiss, 2011). As células estaminais mesenquimatosas humanas, isoladas da Geleia de Wharton do CU têm a capacidade de se diferenciar, *in vitro*, em células osteogénicas, condrogénicas, adiposas e miogénicas(Yang et al., 2008). Estas células apresentam uma vantagem interessante: não só são MHC Classe II negativas, tendo um fenótipo em termos imunitários privilegiado, como os seus níveis de expressão MHC Classe I podem ser manipulados, fazendo delas uma potencial fonte de células mesenquimatosas para terapia celular (Baksh, Yao, & Tuan, 2007).

OBJECTIVOS DO ESTUDO

Pretende-se testar um biomaterial, o polivinil álcool hidrogel em co-polimerização com o dextrano (Dx), para o fabrico de próteses vasculares associado a um sistema celular (células estaminais mesenquimatosas da geleia de *Wharton* do cordão umbilical) de forma a melhorar a biointegração do biomaterial. Foi então idealizado um modelo animal e estabelecidos alguns objectivos numa tentativa de contribuir para o estudo da bioengenharia aplicada ao desenvolvimento de uma nova prótese vascular sintética. Com este estudo pretendeu-se igualmente investigar e conseguir ultrapassar algumas das limitações anteriormente referidas para as próteses vasculares sintéticas:

- a) Formação de trombos e/ou hiperplasia da íntima
- b) Formação de pseudo-aneurismas
- c) Insuficiente biointegração e endotelização o interior das próteses vasculares.

Pretende-se com este trabalho atingir os seguintes objectivos específicos:

- a) Através da implantação subcutânea (Figura 9) de membranas de PVA/Dx no modelo animal
 - 1. Avaliar a biocompatibilidade do co-polímero PVA/Dx seguindo a norma ISO10993-6

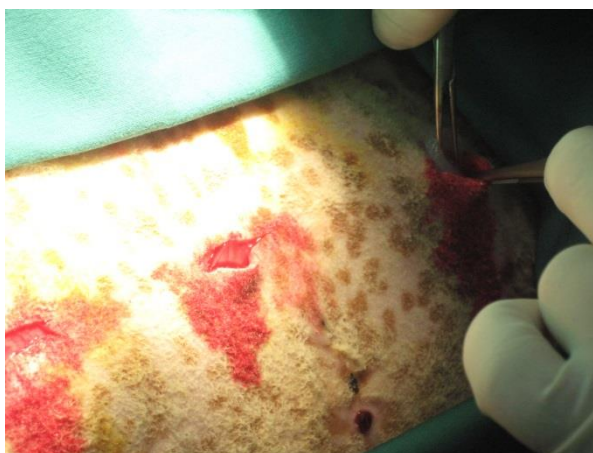


Figura 9 – Implantação subcutânea de membranas de PVA/Dx para avaliação da biocompatibilidade.

- b) Através do contacto *in vitro* de membranas de PVA/Dx com o sangue e seus derivados (plasma rico em plaquetas e plasma pobre em plaquetas)

1. Avaliar a hemocompatibilidade através da determinação do índice de hemólise
 2. Avaliar a trombogenicidade *in vitro* pela quantificação da adesão/ activação plaquetária e pela medição do tempo de coagulação do sangue total
 3. Avaliar a activação *in vitro* do sistema coagulação pela medição dos perfis de recalcificação do plasma e pela medição do complexo trombina-antitrombina
- c) Através da implantação de próteses vasculares de PVA/Dx com 5 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro interno (Figura 10) na artéria carótida comum esquerda do modelo animal



Figura 10 – Prótese vascular de PVA/Dx.

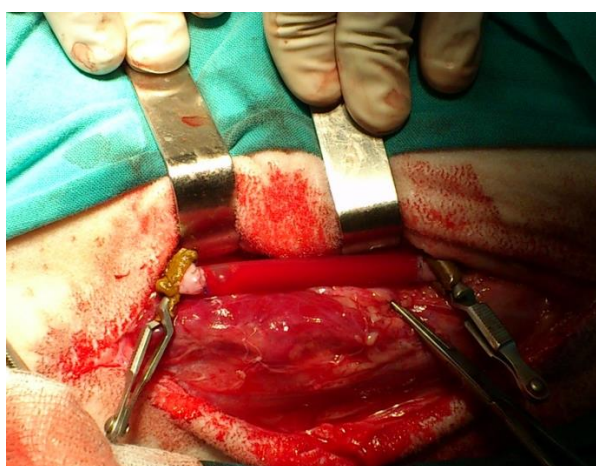


Figura 11 – Prótese vascular de PVA/Dx implantada na artéria carótida comum esquerda de um ovino.

1. Testar *in vivo*, em termos de biointegração e trombogenicidade, o biomaterial PVA em anastomoses vasculares utilizando enxertos vasculares de PVA/Dx (com ou sem células estaminais mesenquimatosas).
2. Testar *in vivo*, os enxertos de PVA/Dx: a) funcionalmente (Figura11)., em termos de manutenção e velocidade do fluxo sanguíneo; e b) estruturalmente, em termos de manutenção do diâmetro interno e externo através de ecografia em modo B e *Doppler*
3. Testar *in vivo* as interações do sangue com o biomaterial pela determinação de vários parâmetros hematológicos e da coagulação durante 16 semanas do período experimental.
4. Testar *in vivo*, o sistema celular na promoção da biointegração dos enxertos de PVA/Dx.
5. Demonstrar *in vivo*, que os enxertos vasculares de PVA/Dx com comprimento superior a 20 mm, mantém propriedades funcionais e de biointegração compatíveis com a sua utilização clínica.
6. Avaliar *ex vivo* através de análise histopatológica e imunohistoquímica o desempenho estrutural dos enxertos vasculares de PVA/Dx (Figura 12).

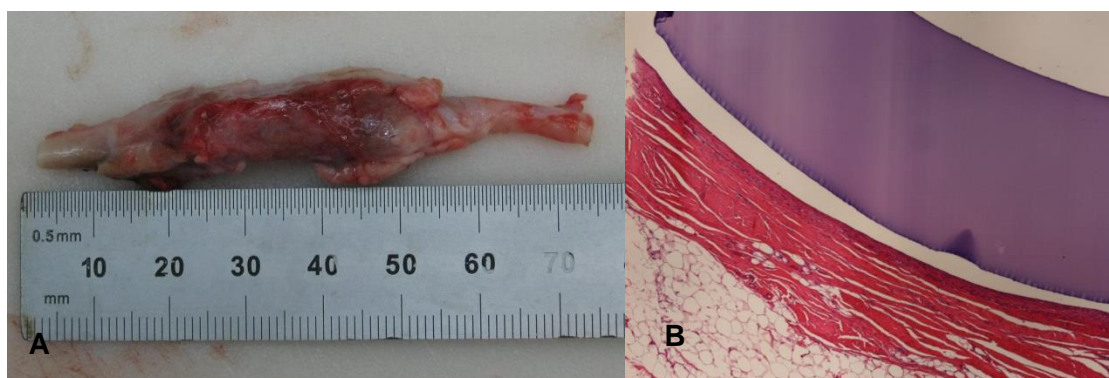


Figura 12 – (A) Prótese de PVA/Dx recolhida de um ovino às 12 semanas pós-implantação, (B) Imagem microscópica de prótese vascular de PVA/Dx e tecido envolvente (40x, H&E).

Tabela 4 - Esquematização dos grupos para a realização do trabalho experimental

Identificação do animal	Tipo de prótese	Comprimento/ID	Tempo de implantação
G1.1	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	4 semanas
G1.2	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	8 semanas
G1.3	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	12 semanas
G1.4	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	16 semanas
G1.5	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	20 semanas
G1.6	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	24 semanas
G2.1	PVA/Dx + MSCs + anticoagulante	5 cm/5 mm	4 semanas
G2.2	PVA/Dx + MSCs + anticoagulante	5 cm/5 mm	8 semanas
G2.3	PVA/Dx + MSCs + anticoagulante	5 cm/5 mm	12 semanas
G2.4	PVA/Dx + MSCs + anticoagulante	5 cm/5 mm	16 semanas
G2.5	PVA/Dx + MSCs + anticoagulante	5 cm/5 mm	20 semanas
G2.6	PVA/Dx + MSCs + anticoagulante	5 cm/5 mm	24 semanas
G3.1	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	4 semanas
G3.2	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	8 semanas
G3.3	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	12 semanas
G3.4	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	16 semanas
G3.5	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	20 semanas
G3.6	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	24 semanas
G4.1	ePTFE	5 cm/5 mm	4 semanas
G4.2	ePTFE	5 cm/5 mm	8 semanas
G4.3	ePTFE	5 cm/5 mm	12 semanas
G4.4	ePTFE	5 cm/5 mm	16 semanas
G4.5	ePTFE	5 cm/5 mm	20 semanas
G4.6	ePTFE	5 cm/5 mm	24 semanas

CAPITULO III

RESULTADOS

1. Avaliação da biocompatibilidade, hemocompatibilidade e trombogenicidade

1.1. Introdução

A avaliação da biocompatibilidade de um biomaterial antes da sua aplicação em ensaios pré-clínicos é uma etapa fundamental do desenvolvimento de uma prótese vascular sintética. Permite avaliar a severidade da reacção inflamatória que determinado biomaterial causa nos tecidos que envolvem e eventualmente permite também a sua modificação da sua composição química, processo de fabrico e estrutura física antes de se aplicar num modelo animal pré-clínico. De modo a quantificar e a objectivar a biocompatibilidade através da graduação da reacção inflamatória seguiram-se as linhas orientadoras fornecidas pelo anexo E da norma ISO 10993-6. O parâmetro resultante da quantificação da reacção inflamatória permite a classificação dos biomateriais em não-irritante ou inerte, ligeiramente irritante, moderadamente irritante e severamente irritante. Não se aconselha a utilização de biomateriais considerados moderadamente irritantes ou severamente irritantes no fabrico de próteses vasculares.

A caracterização da hemocompatibilidade e trombogenicidade dos biomateriais que entram na composição de dispositivos que contactam com o sangue são dois factores críticos para prever o seu desempenho funcional *in vivo*. A determinação de hemólise clássica seguiu a norma da *American Society for Testing on Materials* (ASTM F756-00, 2000). O índice de hemólise é um indicador da interacção do material com os eritrócitos (Fernandes et al., 2008) e poderá classificar o biomaterial em não hemolítico (<2%), ligeiramente hemolítico (2-5%) e moderadamente hemolítico (>5%). A interacção do biomaterial com o sangue é também caracterizada pela determinação da trombogenicidade que compreende parâmetros de adesão e activação plaquetária bem como parâmetros de activação do sistema de coagulação. A trombogenicidade Para quantificação da adesão recorreu-se ao ensaio de actividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Tamada, Kulik, & Ikada, 1995). A activação plaquetária foi avaliada qualitativamente através da observação do fenótipo das plaquetas aquando do contacto com as superfícies pela análise de imagens de SEM. Uma avaliação mais objectiva da activação plaquetária foi realizada por citometria de fluxo onde a expressão do receptor CD62P foi usada para identificar plaquetas activadas. O tempo de coagulação de sangue total tem sido utilizado por diversos autores também como um indicador da trombogenicidade de biomateriais (Motlagh, et al., 2006). A activação da via intrínseca pelos biomateriais tem sido quantificada por diversos autores (Motlagh et al., 2006) da coagulação foi quantificada pela medição do perfil de recalcificação do plasma. Outro indicador da activação da coagulação por nós utilizado mede de forma indirecta a formação de trombina pelo doseamento do complexo trombina-antitrombina. Um baixo

nível de activação da trombina pelo biomaterial é indicador de boa hemocompatibilidade. Os resultados de todos estes parâmetros avaliadores da hemocompatibilidade *in vitro* são um bom indicador do desempenho funcional dos biomateriais que contactam com o sangue e ausência de resultados satisfatórios aconselha a sua não utilização em ensaios pré-clínicos.

1.2. Artigo 1

Journal of Bioactive and Compatible Polymers (2012) 28(1) 97–112

STUDIES ON THE BIOCOMPATIBILITY OF BACTERIAL CELLULOSE

Studies on the biocompatibility of bacterial cellulose

Journal of Bioactive and
Compatible Polymers
28(1) 97–112
© The Author(s) 2012
Reprints and permission:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0883911512467643
jbc.sagepub.com


**Fábia K Andrade¹, Nuno Alexandre^{2, 3}, Irina Amorim⁴,
Fátima Gartner⁴, Ana Colette Maurício^{5, 6},
Ana Lúcia Luís^{5, 6} and Miguel Gama¹**

Abstract

Bacterial cellulose was functionalized with a chimeric protein containing a cellulose-binding module and the adhesion peptide Arg-Gly-Asp. Small-diameter bacterial cellulose membranes were produced and subcutaneously implanted in sheep for 1–32 weeks. The implants triggered a biological response similar to other high surface-to-volume implants. There were no significant differences in the inflammation degree between the bacterial cellulose coated with the recombinant protein Arg-Gly-Asp–cellulose-binding module and the native bacterial cellulose. The implants were considered to be mildly irritating to the tissue compared to the negative control sample (expanded polytetrafluoroethylene). The analysis of the fluorescence microscopy revealed that, apart from increasing cell adhesion, the presence of Arg-Gly-Asp stimulated an even cell distribution, while the cells on the untreated bacterial cellulose seemed to form aggregates. Furthermore, the cells on the Arg-Gly-Asp–treated bacterial cellulose presented a more elongated morphology. Mechanical tests indicated that the small-diameter bacterial cellulose tubes were more elastic than the human arteries and veins.

Keywords

Bacterial cellulose, bacterial cellulose biocompatibility, tissue engineering, cell adhesion, mechanical properties, adhesion peptide Arg-Gly-Asp, arteries and veins

¹IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

²Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Évora, Portugal

³ICAAM-Instituto de Ciências Agro-Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Évora, Portugal

⁴Department of Pathology and Molecular Immunology, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar (ICBAS), Porto University, Porto, Portugal

⁵Animal Science and Study Centre (CECA)/Food and Agrarian Sciences and Technologies Institute (ICETA), Porto University, Porto, Portugal

⁶Department of Veterinary Clinics, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar (ICBAS), Porto University, Porto, Portugal

Corresponding author:

Miguel Gama, IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus of Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.

Email: fmgama@deb.uminho.pt

Introduction

The aim of tissue engineering and regenerative medicine is to promote regeneration of diseased or damaged human tissues. Biomaterials are used to build scaffolds in which cells and/or growth factors are seeded, cultured and then implanted to induce and direct the growth of new healthy tissue.¹ Among the biomaterials used, natural polymers represent one of the most attractive options; they are similar to biological macromolecules and are expected to have better biocompatibility. Although several groups described the successful production of tissue-engineered blood vessels,^{2–7} it must be recognized the cost and length of time required for the production of functional tissue. The long culture time required brings about the question of safety, due to possible cell differentiation. Therefore, using a biomaterial with good mechanical properties that favour cell colonization may provide a ‘mixed’ tissue-engineered/artificial prosthesis approach, allowing a prompt utilization and good tissue integration.

Bacterial cellulose (BC), a pure form of cellulose secreted by bacteria, such as *Gluconacetobacter xylinus*, has unique properties, including high water-holding capacity, high crystallinity, ultrafine fibre network, high tensile strength (TS) and the possibility to be shaped into three-dimensional (3D) structures during synthesis.⁸ These features make BC a promising material for the production of scaffolds in tissue engineering. In fact, several researchers have proposed BC as a scaffold for cartilage,^{9,10} wound dressing,^{11–13} dental implants,^{14–20} nerve regeneration,^{21,22} bone regeneration^{23,24} and vascular grafts.^{22,25,26}

However, very few studies on the in vivo biocompatibility of BC have been published.^{22,27–31} Biocompatibility is a major requirement for any biomedical material. It can be defined as the ability to remain in contact with living tissue without causing intolerable toxic or allergic side effects while performing its function.³² In this context, BC has been modified to further enhance biocompatibility. The functionalization of BC using bioactive peptides was successfully developed in our research group for vascular replacements.³³ The attachment of cells to biomedical materials can be improved by using adhesion molecules, such as fibronectin, vitronectin or laminin. These molecules, present in the extracellular matrix (ECM) of proteins, regulate the adhesion, migration and growth of cells by binding to integrin receptors located on the outer cellular membranes. The amino acid sequence, Arg-Gly-Asp (RGD), is known as the minimal essential cell adhesion peptide sequence present in these proteins. In the previous work, we described the production of recombinant proteins containing RGD sequences fused to a cellulose-binding module (CBM).³³ The use of a CBM (a protein exhibiting high adsorption affinity and specificity for cellulose surfaces) fused with biologically active peptides provided a simple and effective approach to decorate the BC surface. This concept was further demonstrated using human microvascular endothelial cells (HMECs).²⁵ The chimeric proteins were able to enhance endothelial cell adhesion to BC and stimulate angiogenesis.

In this study, we investigated the mechanical properties of BC tubes and the in vivo and in vitro biocompatibility of BC membranes for tissue-engineered blood vessels. The fate of long-term subcutaneous implants was analysed in sheep for 32 weeks. Once the recombinant protein contained bacterial CBM, the in vivo biocompatibility of native and RGD-CBM-treated BC membranes was analysed to determine whether the presence of the recombinant protein gave rise to any immunologic reaction. The implants were evaluated for chronic inflammation, foreign body responses, cell ingrowth and angiogenesis. The in vitro biocompatibility was evaluated using 3T3 mouse embryo fibroblast cultures, and the viability, morphology and cell ingrowth were analysed by the MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] assay, fluorescence and cryo-scanning electron microscopy (CryoSEM).

Material and methods

Production of BC

Gluconacetobacter xylinus (ATCC 53582) purchased from the American Type Culture Collection was grown in Hestrin–Schramm medium, pH 5.0. The medium was inoculated with the culture, added to the 24-well polystyrene plate (1 mL per well) and incubated statically at 30 °C for 5 days. The BC pellicles were purified by 2% sodium disulphide sulphonate (SDS) treatment at 60 °C, for 12 h, washed with distilled water until complete removal of SDS and then immersed in 4% NaOH at 60 °C for 90 min. After neutralization with distilled water, the samples were autoclaved and stored in phosphate-buffered solution (PBS), pH 7.4, at 4 °C, until use. The pellicle produced in a 24-well polystyrene plate presented a 15.5 mm diameter.

Preparation of tubular BC. The cultivation system used for the production of BC tubes (Figure 1) was autoclaved and the Hestrin–Schramm medium was inoculated and added to the system. A layer of sterilized oil was placed surfacing the culture medium to reduce the growth of the bacteria at the air–liquid interface. The oxygen permeable silicon tube allowed the growth of the strictly aerobic bacteria next to the tube wall. To avoid the formation of air bubbles on the surface of the silicon tube – leading to irregularly shaped BC tubes – the system was first connected to an air supply for 4 days in an open circuit. After the formation of a thin BC pellicle, the air supply was disconnected and pure oxygen was injected at 0.5 bar for 14 days and allowed the production of a BC tube with 3 mm of inner diameter. The BC tubes were removed from the silicon mould and treated with a 4% NaOH solution, at 60 °C, for 12 h. The purified tube was then neutralized with filtered distilled water, autoclaved and stored in PBS, pH 7.4, at 4 °C, prior to use.

Surface modification of BC with RGD-CBM protein

For surface modification of BC, the purified recombinant protein was added to the wells of 24-well polystyrene plates (0.25 mg of protein/well), coated with bacterial cellulose sheets produced in similar 24-well polystyrene plates as described in our previous work.³³ The plates were incubated overnight at 4 °C. Unbound protein was removed, and the BC pellicles were washed with PBS and used in the in vitro and in vivo biocompatibility assays.

Young's modulus (E), TS and elongation-at-break (ε%)

TS, E and ε% were measured with an Instron Universal Testing Machine (Model 4500, Instron Corporation, Norwood, MA, USA). The initial grip separation was set at 15 mm, and the crosshead speed was set at 5 mm/min. TS was the stress needed to break a sample and calculated by dividing the maximum load (N) by the initial cross-sectional area (m²) of the specimen and is expressed in megapascals. E is the initial slope of the stress–strain curve and expressed in megapascals. ε% is the strain on a sample when it breaks. It was calculated as the ratio of the increased length to the initial length of a specimen (15 mm) and expressed as a percentage. BC tube was stretched lengthwise; 15 tubes were used in the test.

Fibroblast adhesion and proliferation

The mitochondrial activity of the cultured cells was determined using a colorimetric assay, commonly used as a measure of cell viability. The MTS assay was performed as follows: the purified recombinant proteins were added to the wells of the 24-well polystyrene plates (0.25 mg of protein/well), coated with BC sheets. The BC sheets were produced in similar 24-well polystyrene

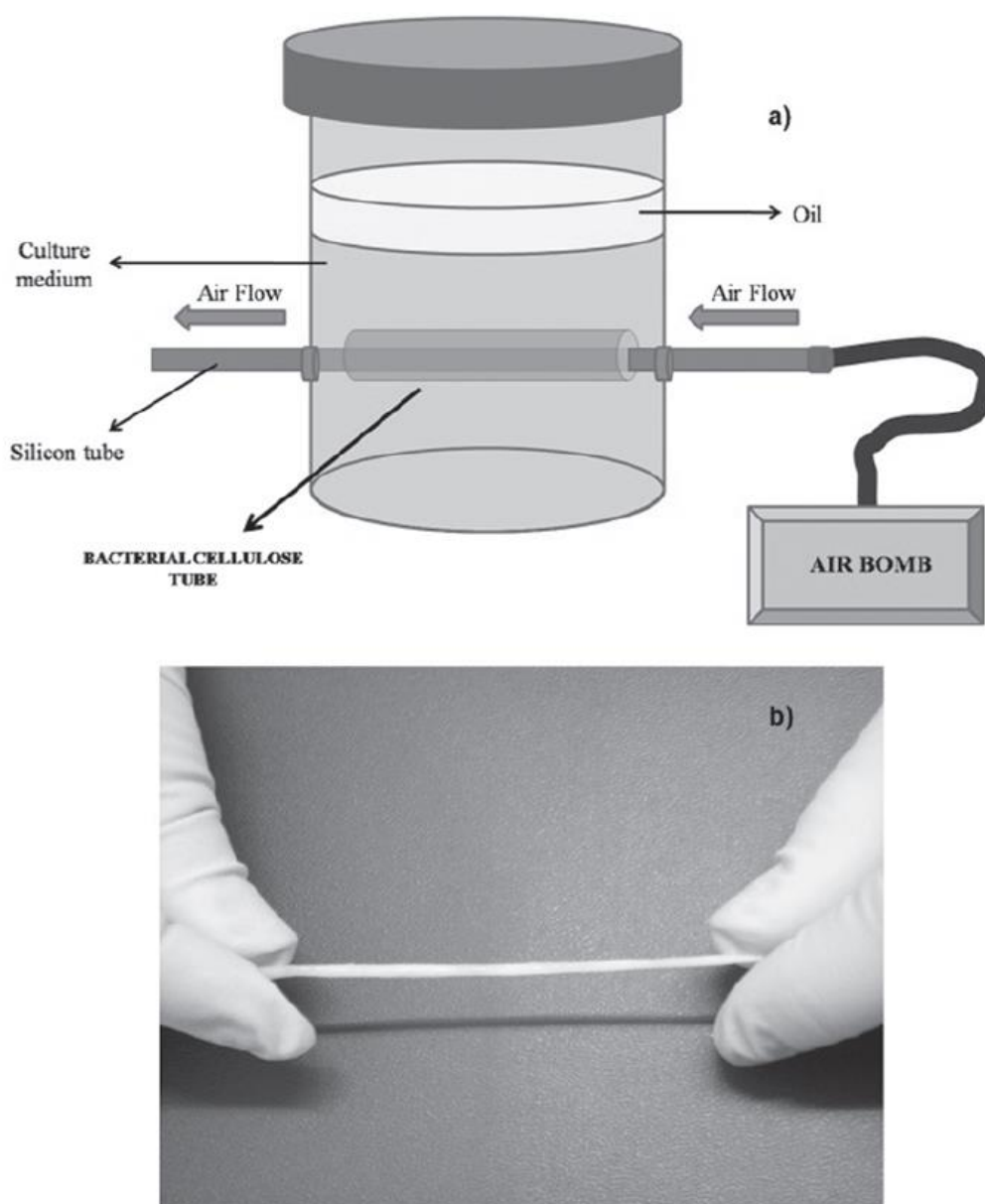


Figure 1. Bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 53582) grows around the silicon tube when an airflow is injected through the tube. (a) Scheme of the cultivation system and (b) bacterial cellulose tube.

plates, so as to fit tightly in the wells, completely covering the bottom surface. The fibroblasts 3T3 were seeded with 12×10^4 cells/well in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) without serum. Two hours after the addition of the cells, the wells were washed with PBS and DMEM with serum (10%) was added. The MTS assay of the attached and spreading 3T3 fibroblasts was carried out at 2 h, 72 h and 7 days, respectively, after the addition of the cells. The plates were incubated at 37 °C, in atmosphere of 5% CO₂ and 95% humidified air. The results were obtained from three different assays with triplicate samples.

Morphological analysis by fluorescent microscopy

After 2 h, 72 h and 7 days after cell seeding on BC membranes untreated or treated with the RGD-CBM protein, the membranes were washed with pre-warmed PBS; the cells were then fixed in 4% formaldehyde (Pierce, Rockford, IL, USA) in PBS, permeabilized with acetone (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at -20°C and stained with Alexa Fluor 546-phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Nuclei were visualized by staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Microscopy observations were performed using an Olympus BX51 (Olympus Portugal SA, Porto, Portugal) fluorescence microscope.

Cryo-scanning electron microscopy

After 14 days of cell seeding on BC – untreated or treated with the RGD-CBM protein – the membranes were washed with pre-warmed PBS; the cells were then fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS. Samples were washed in ultrapure water, and a piece of BC membrane was placed between two miniature rivets on a vacuum transfer rod and slam frozen in a nitrogen slush and transferred to the cryostat chamber, which was maintained at -150°C . The top rivet was taken off to produce a fractured surface, the ice was sublimed at -90°C during 2 min (for visualization of fibres on the dense side of BC) or 4 min (for visualization of fibres on the porous side of BC) and then the fractured surface was coated with gold/palladium. Afterwards, the sample was transferred to the microscope chamber, which was also maintained at -150°C and examined at 15 kV using a working distance of 15 mm. The samples were analysed by use of a CryoSEM (Model Gatan ALTO 2500) at CEMUP (Centre for Materials Characterization from the University of Porto).

To visualize the BC tube fibres, samples were cut longitudinally and transversely. The transversal section was fractured and sublimed during 10 min; the longitudinal section was not fractured but sublimed for 30 min.

In vivo biocompatibility studies

Experimental animals. Eighteen adult female white merino sheep (~60 kg each) were randomly divided in three groups of six animals each. Group number 1 was implanted with untreated BC discs, and group number 2 was implanted with BC discs (15.5 mm in diameter) and treated with recombinant protein (RGD-CBM). The control group, number 3, was implanted with expanded tetrafluoroethylene (MAXIFLO™ ePTFE Vascular Prosthesis, Vascutek Ltda, Scotland) disc samples with the same area as the BC implants.

Surgical procedures. The animals were solids fasted for 48 h prior to the surgical procedure. An intravenous catheter of 20G was placed at the cephalic vein, and xylazine (0.2 mg/kg, intravenous) was given as a tranquilizer, followed by sodium thiopental, 15 mg/kg intravenous as the anaesthetic. The anaesthetic maintenance was isoflurane at 2% via endotracheal intubation carried by 100% oxygen with a 2 L/min flow.

For surgery, the sheep were placed in sternal recumbence over a tilted table so that the animal's head and neck were always lower than the stomach to reduce risks of aspiration pneumonia. The wool was clipped in roughly square areas, and the skin was aseptic prepared with iodopovidone solution. The incisions were made over the dorsal area, starting over the last ribs and ending just cranially to the sacrum. These 3-cm-length incisions, three on the left side and two on the right one, were made parallel and 4 cm off the dorsal midline with 3 cm between incisions. After exposing

the dorsal muscles, the BC/expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) disc samples were inserted under the skin distally to the midline. Subsequently, the skin was closed with a Supramid® USP1 suture and the ewes transferred to straw pens (4 m × 3 m) after surgery. The skin sutures were not removed in order to localize the implant site.

Histological evaluations. The implants and the surrounding tissue were collected after a peripheral infiltration of 2% lidocaine, at 1, 2, 4, 8, 16 and 32 weeks post implantation. Two samples were collected from each animal, randomly selected from each group at specific temporal points. The samples were fixed in 10% formalin, paraffin embedded, cut in 2 µm and stained with haematoxylin and eosin (HE) for histological evaluation. The biological response parameters were assessed in the implant–tissue interface with three high power fields (×400) by at least two pathologists, for each sample and recorded in an appropriate formulary. All the biological response parameters were evaluated according to the ISO standard 10993-6 (annex E) which included the extent of fibrosis/fibrous capsule (layer in micrometres) and inflammation; the degeneration as determined by changes in tissue morphology; the number and distribution from the material–tissue interface of the inflammatory cell types, namely polymorphonuclear neutrophilic leucocytes (PMN), lymphocytes, plasma cells, eosinophils, macrophages and multinucleated cells; the presence, extent and type of necrosis; other tissue alterations such as vascularization, fatty infiltration and granuloma formation and the material parameters such as fragmentation and/or debris presence, form and location of remnants of degraded material. Based on the scoring system for the parameters, a total value was obtained for each animal in each group. The group value was subtracted by the control group value, and the test sample was recorded as follows:

Non-irritant (0.0 up to 2.9), slight irritant (3.0 up to 8.9), moderate irritant (9.0 up to 15.0) and severe irritant (> 15) to the tissue as compared to the control sample irritant. Adverse histological responses were documented by photomicrography.

The collected data were submitted to statistical analyses. Analysis of variance followed by the Tukey multiple comparisons test was used to evaluate the statistical differences between the groups using the GraphPad Prism 5.0 software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Measures were taken to minimize pain and discomfort taken in account for animal suffering and distress during the in vivo testing. All procedures were performed with the approval of the Veterinary Authorities of Portugal in accordance with the European Communities Council Directive of November 1986 (86/609/EEC).

Results and discussion

The production of the BC tubes was carried using different techniques as described in the literature.^{22,34} Gatenholm and his group^{26,35,36} produced BC tubes by submerging silicone tubing in a test tube containing culture medium. The set-up used in this work for the production of BC tubes (Figure 1) was similar to the one used by the Gatenholm group to produce BC tube with a smoother and denser luminal side and a more porous outer side (Figure 2). According to Backdahl et al.,²⁶ a smoother luminal surface, similar to the basal membrane of the luminal side of blood vessels, is preferable for the attachment of endothelial cells, while a porous outer side facilitated the integration with the host tissue better. The CryoSEM results also showed that, unlike the tubes produced by Putra et al.³⁴, no orientation of the fibrils network was observed.

The lower Young's modulus (E) values for the BC tubes were associated with minor vessel wall stiffness. The BC tubes produced in this work were more elastic lengthwise (lower E, 0.25 ± 0.07 MPa) than human arteries and veins and much lower than collagen and PTFE, two common

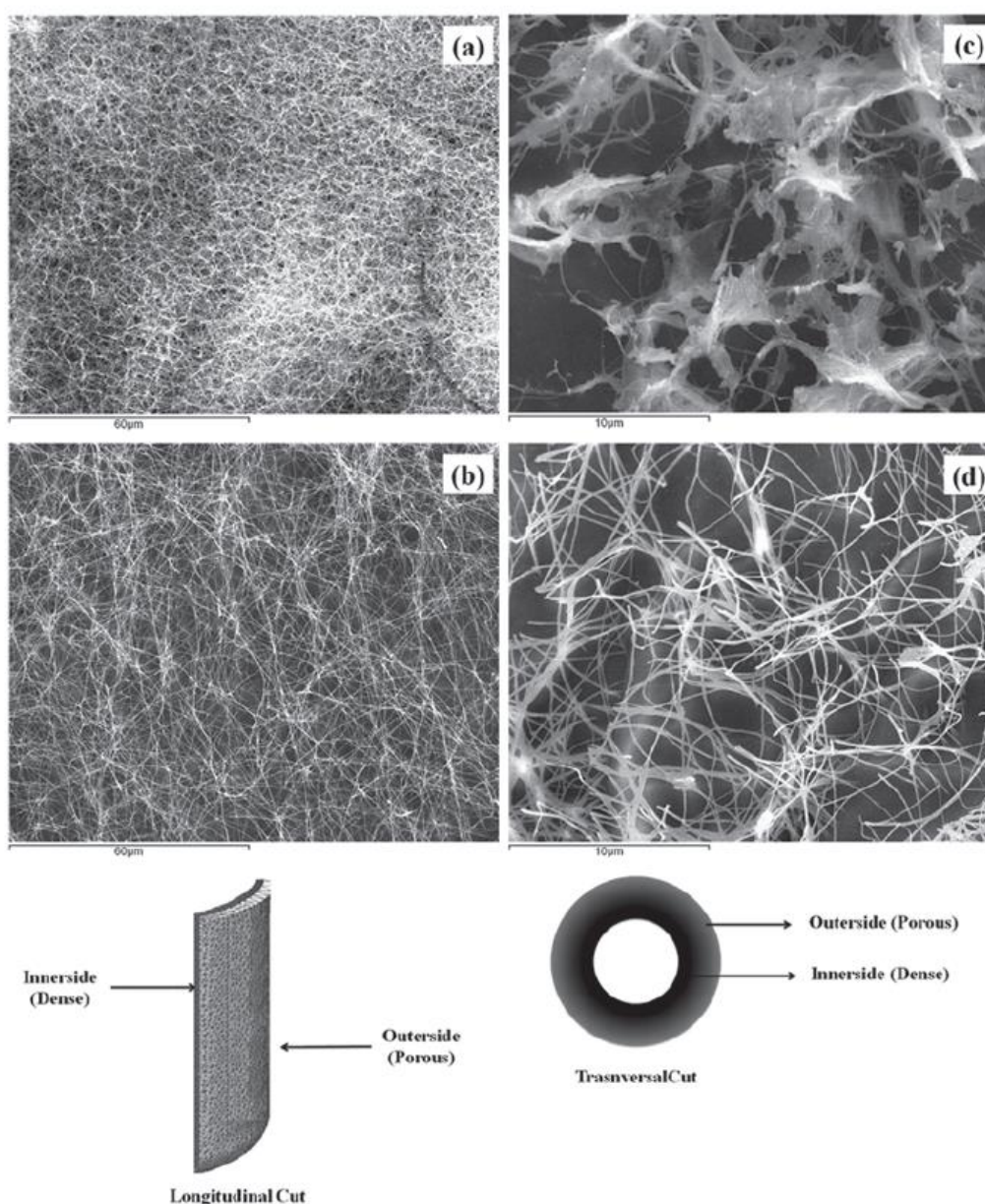


Figure 2. CryoSEM micrographs of bacterial cellulose tubes. Visualization through a longitudinal cut of (a) inner side and (b) outer side. Visualization through a transversal cut of (c) inner side and (d) outer side. Scale 60 μm (longitudinal images) and 10 μm (transversal images).

polymers used as vascular grafts (Table 1). Typical plots of wall stress versus strain in BC tube segments are shown in Figure 3 with an $\epsilon\%$ of $31\% \pm 4.4\%$, a value higher than collagen (10%) but lower than PTFE (200–400). The TS from our BC tube was 0.19 ± 0.03 MPa, a value lower than the one obtained by Putra et al.³⁴ (0.59 MPa). Although the values are in the same order of magnitude, the different properties may be assigned to variable thickness of the tubes. The TS values for the BC tubes (obtained in our lab and described by Putra et al.³⁴) are one order of magnitude lower than the ones reported for human arteries and veins (Table 1). According to Sanchavanakit et al.,³⁷ a BC dried film (from a 48-h culture) with a thickness of 0.12 mm presents a TS and break strain

Table 1. Comparison of the mechanical properties of BC tubes (3 mm of inner diameter and 1 mm of wall thickness) produced in this present work with BC tubes produced by Putra et al.,³⁴ human arteries and veins and common polymers used as vascular grafts (collagen and PTFE)

	Young's modulus (MPa)	Tensile strength (MPa)	Elongation (%)	References
BC tube	0.25 ± 0.07	0.19 ± 0.03	31 ± 4.4	*
BC tube	0.06	0.59	—	Putra et al. ³⁴
Arteries	1.54	1.57	—	Pukacki et al. ³⁹ and Purinya et al. ⁴⁰
Veins	3.11	2.65–3.3	—	Pukacki et al. ³⁹ and Purinya et al. ⁴⁰
Collagen	1000	50–100	10	Martins. ⁴¹
PTFE	400	14–35	200–400	Martins. ⁴¹

*: BC tubes produced in this work; '—': not described.

Values are presented as mean \pm standard deviation.

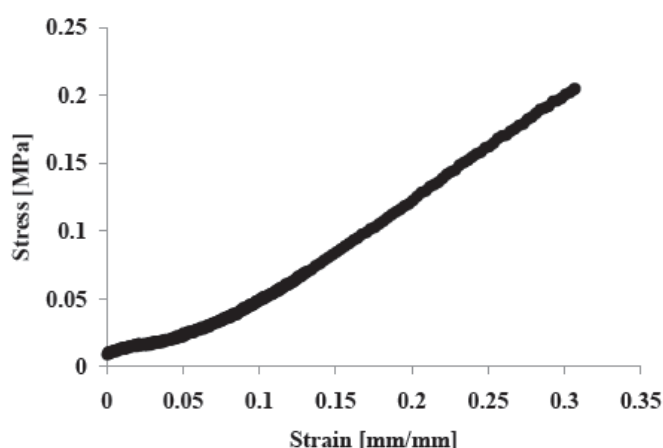


Figure 3. Tensile stress–strain curves of the lengthwise of BC tubes with an inner diameter and wall thickness of 3 and 1 mm, respectively.

of 5.21 MPa and 3.75%, whereas for the re-swollen films, the values are 1.56 MPa and 8.0%, respectively. McKenna et al.³⁸ reported a TS value of wet BC sheet grown between 48 and 96 h of 1.1–2.2 MPa, $\epsilon\%$ of 16%–27% and E of 10–14 MPa. The BC production, as well as the mechanical properties, is influenced by the carbon and nitrogen sources and concentration, the pH and temperature, time of cultivation, the surface area of the fermentation system, the type of cultivation system (e.g. static or agitated cell culture) and differences in the bacterial strains. In addition, the treatment after synthesis influenced the properties of BC membranes.⁸

The mechanical properties of the BC tubes produced using the method adopted in this work are inferior to the properties of both the commercial grafts available and the natural blood vessels. Therefore, a different method to provide thicker BC walls is required (ongoing work). Although BC is frequently referred to as exhibiting superior mechanical properties, its application as vascular grafts requires some improvement in this regard.

In vitro studies on the BC–cell interactions

In a static culture, *G. xylinus* builds up a cellulose network much denser on the culture medium–air interface than on the opposite side.^{22,26} The MTS test (Figure 4) indicated no significant differences in the fibroblast adhesion to the BC porous or dense side and also that the cells proliferated equally well on both sides, as previously reported in a study using human smooth muscle cells (SMC).²⁴ The effect of the recombinant protein (RGD-CBM) on the adhesion of fibroblasts to BC was previously discussed.³³ Fluorescence microscopy of the cell–BC interaction was more detailed in this work (Figure 5), apart from increasing cell adhesion – as observed in MTS assays – the presence of RGD stimulated a uniform distribution of the cells which is important to the endothelialization of the graft, while cells coating the untreated BC seem to form aggregates (the images containing only labelled nuclei in Figure 5 allow a better visualization of this effect).

The cells on the RGD-treated BC were more elongated than the cells covering the untreated pellicle on both sides as shown in Figure 6. The more extended morphology, upon interaction with the adhesive peptides, seems to be driven by the greater number of focal contacts between integrins and RGD-containing peptides linked to the BC surface. It is known that a critical RGD density is essential for the establishment of mature and stable integrin adhesions, which, in turn, induce efficient cell migration, spreading and formation of focal adhesions.^{42–45}

The migration of cells is mediated by integrins, a diverse family of glycoproteins that form heterodimeric receptors for ECM molecules. During migration, cells project lamellipodia that attach to the ECM and simultaneously break existing ECM contacts at their trailing edge which allows the cell to pull itself forward.⁴⁶ Animal cells cannot degrade cellulose²⁸ and must push the nanofibrils aside while migrating into the cellulose network.²⁶ The CryoSEM technique was also used for visualization of cell ingrowth in BC scaffold. The results showed that after 14 days of culture, the cells could not migrate through the BC fibres, once only cells on the surface were

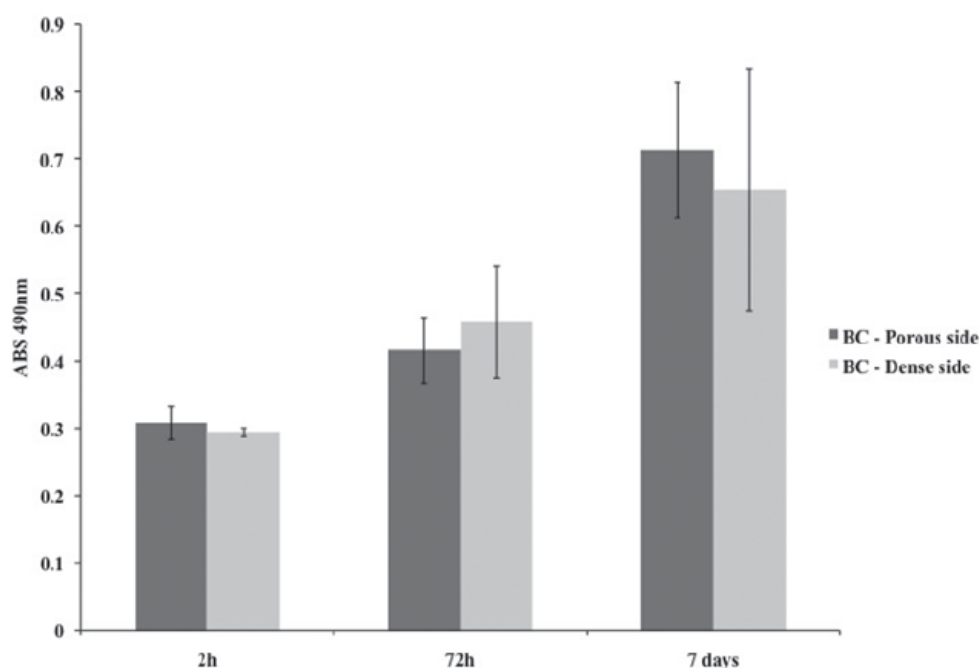


Figure 4. MTS assays of fibroblast cultures at the dense or porous side of BC membrane. The MTS assay was developed at 2 h, 72 h and 7 days after cell seeding. Results are expressed as absorbance values at 490 nm. BC: bacterial cellulose.

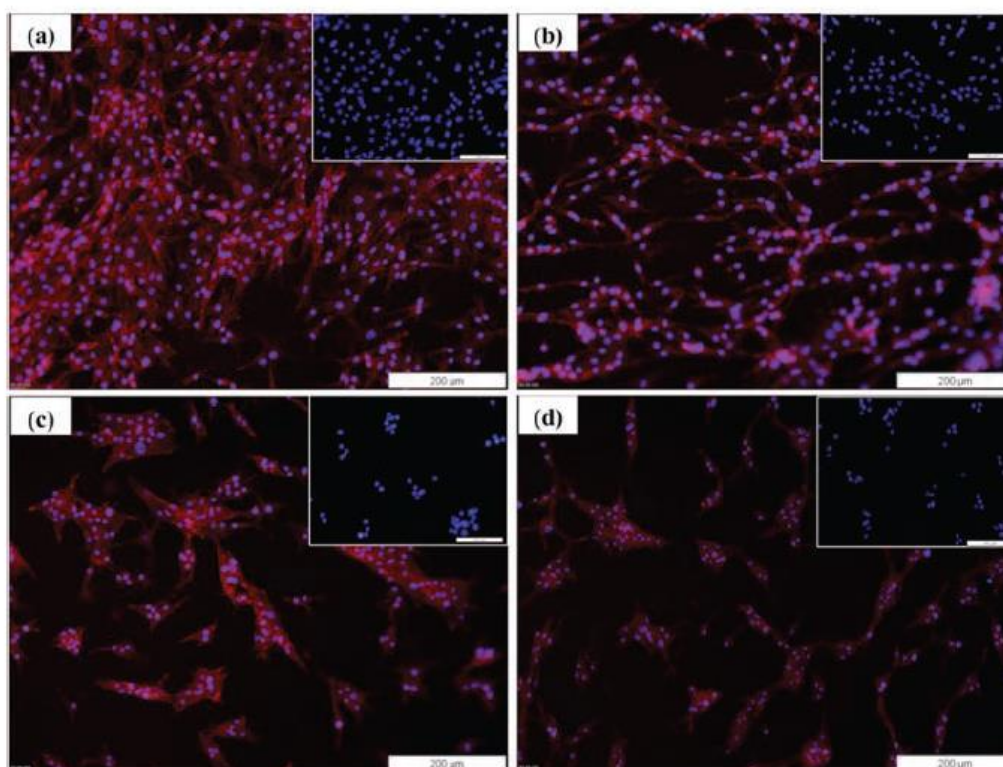


Figure 5. Fluorescent microscopy images showing fibroblast cultured 7 days on BC pellicle. (a) Dense and (b) porous side of RGD-treated BC; (c) dense and (d) porous side of untreated BC. Nuclei were visualized by staining with DAPI (blue) and f-actin with Alexa Fluor 546-phalloidin (red). Actin and nuclei combined images were acquired using objectives 10 \times (scale 200 μ m); nuclei images were acquired using objectives 20 \times (scale 100 μ m).

found. However, it has been demonstrated that cells may migrate through BC membranes. Andrade et al.²⁵ and Backdahl et al.²⁶ demonstrated the ingrowth of HMECs and SMC, respectively, through BC network using an invasion chamber where an attractant (serum, growth factor, etc.) is used to stimulate the cells to grow into the BC - in both cases, the cells were able to invade the fibrous cellulose matrix.

In vivo biocompatibility studies

The effect of the recombinant protein containing a bacterial domain on the biocompatibility of BC implants was examined at 1, 2, 4, 8, 16 and 32 weeks post implantation for inflammatory reactions and degradation. The histology photographs of the BC membranes implanted subcutaneously in sheep and surrounding tissue reaction are shown in Figure 7. Once there were no significant differences in biological responses by the host for untreated or RGD-CBM-treated BC, the images represent the results for both groups of the post-implantation times analysed.

At 1 week post implantation, there was a predominance of PMN and macrophage infiltrate at the implant-tissue junction in both experimental groups 1 and 2 and in the control group (ePTFE), suggesting an acute/subacute inflammatory reaction (Figure 7(a)). In the second week post implantation, an increase in macrophages, plasma cells and lymphocytes infiltration associated to a proliferation of local small blood vessels was compatible with a chronic inflammation. The persistence of the

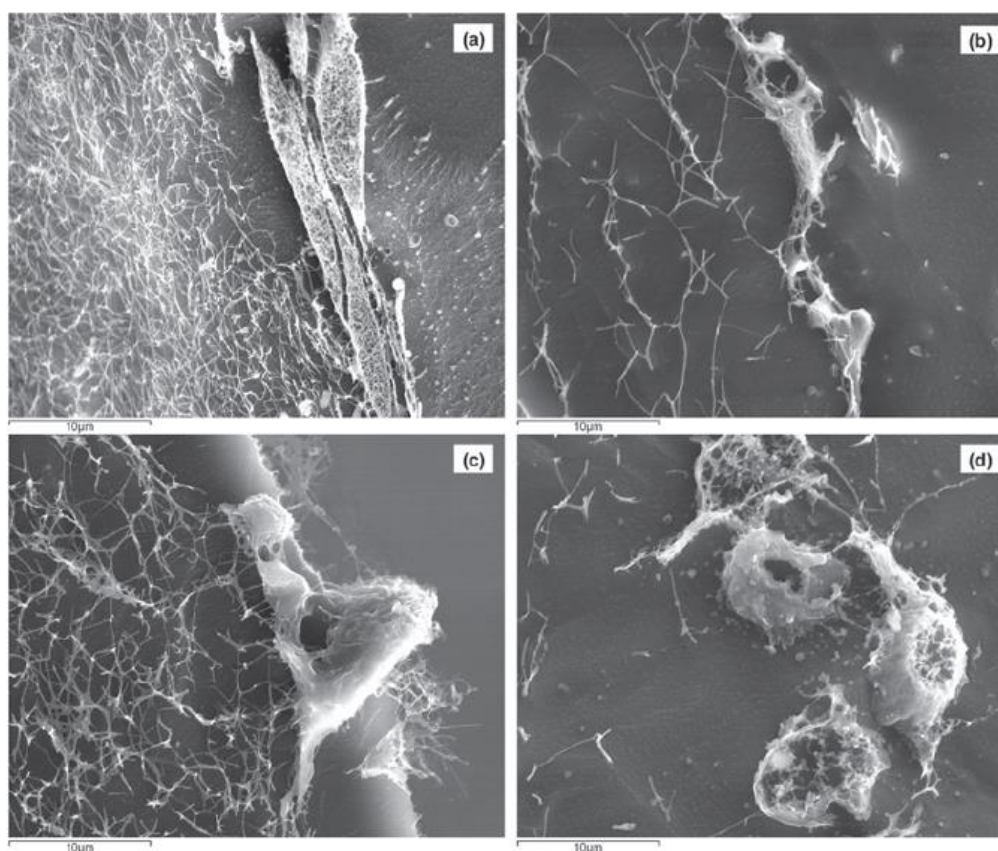


Figure 6. CryoSEM micrographs of bacterial cellulose cultured with fibroblasts after 14 days. (a) Dense and (b) porous side of RGD-treated BC; (c) dense and (d) porous side of untreated BC. Scale 10 μm .

inflammatory stimuli in the BC and control group led to a change from acute to chronic inflammation.⁴⁷ This chronic inflammation response was confined to the implantation site (Figure 7(b)).

During the initial 4 weeks of observation, lymphocytes and macrophages were the most prominent cells in all three groups. The type of cell infiltrate and the increased neovascularisation, surrounding the implant area, were compatible with a chronic inflammation (Figure 7(c)). At 4 weeks post implantation, a more intense inflammation in the experimental group 1 was observed (Figure 8). The macrophages are probably the most important cell type in chronic inflammation because of the great number of biologically active products expressed by these cells.⁴⁸ Among these, the growth factors were responsible for the growth of fibroblasts and blood vessels observed in all groups at 4 weeks post implantation.

After 8 weeks post implantation, a marked decrease in inflammation was detected in both experimental and control groups (Figures 7(d) and 8). These findings can be related to the formation of granulation tissue, the hallmark of healing inflammation, consisting in the proliferation of fibroblasts, macrophages and vascular endothelial cells, and a decrease in inflammatory cells such as PMN and lymphocytes.

The foreign body reaction (FBR), mainly by macrophages, and/or foreign body giant cells at the tissue–implant interface and associated with the fibrous encapsulation were observed at 16 and 32 weeks of the experimental process (Figure 7(e) and (f)). With biocompatible materials, the composition of the FBR in the implant site may be controlled by the surface properties of the biomaterial, the form of the implant and the relationship between the surface area of the biomaterial and the

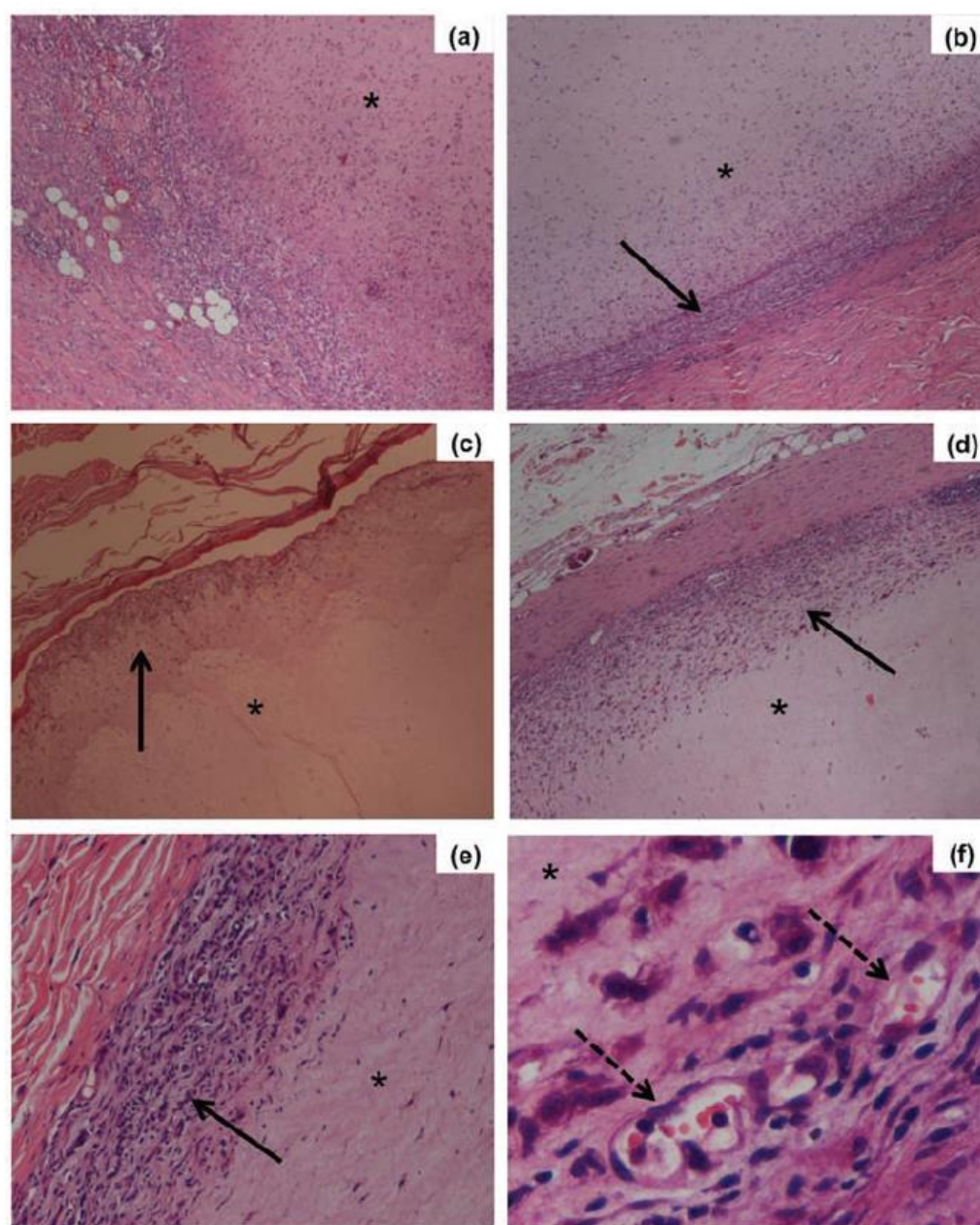


Figure 7. Histomorphology of bacterial cellulose membrane implanted subcutaneously in sheep and surrounding tissue reaction. Once there were no significant differences in biological responses by the host, the images represent the results for both groups of the post-implantation times analysed. (a) 1, (b) 2, (c) 4, (d) 8, (e) 16 and (f) 32 weeks post implantation. (a, b, c, d), (e) and (f), 40 \times , 100 \times and 400 \times magnification, respectively (haematoxylin and eosin staining). The solid arrows indicate the fibrous capsule formation. The dashed arrow on image (f) indicates small blood vessels formation. Asterisks (*) indicate bacterial cellulose.

volume of the implant.^{49,50} High surface-to-volume implants, such as the BC membranes, will have higher counts of macrophages and foreign body giant cells in the tissue–implant surface than that in case of smooth–surface implants.⁵¹ Our results also showed that, although there is a tendency in the formation of a more intense fibrosis in ePTFE implants there were no significant differences

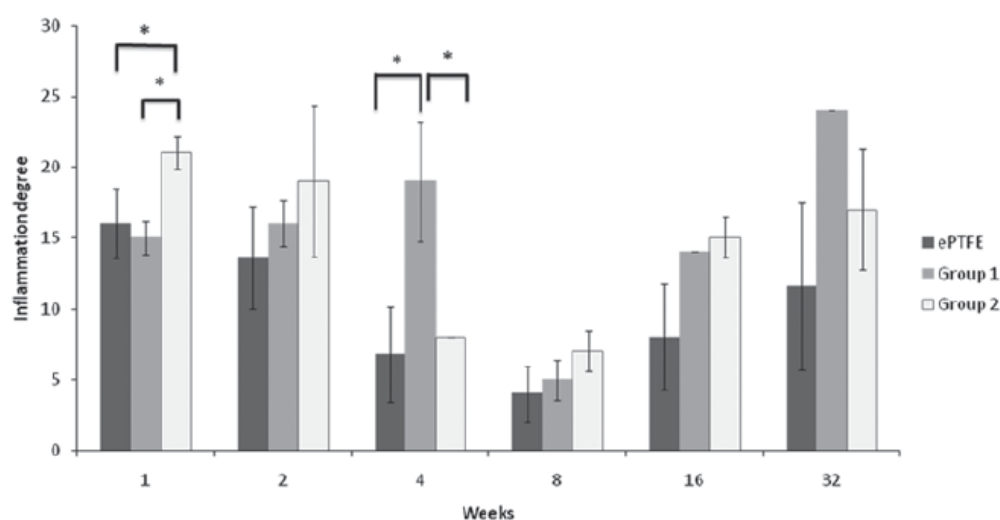


Figure 8. Inflammation degree of untreated BC (group 1), BC treated with RGD-CBM protein (group 2) and control (ePTFE) implants at 1, 2, 4, 8, 16 and 32 weeks post implantation. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated with an asterisk (*). ePTFE: expanded polytetrafluoroethylene.

between the three groups tested at 16 and 32 weeks (Table 2). The neovascularisation was similar to both BC groups and the ePTFE group, especially in the longer periods of implantation (Table 2).

Multinucleated giant cells in the vicinity of a foreign body are generally considered evidence of a more severe FBR; however, it is not uncommon to see very large foreign body giant cells containing large numbers of nuclei on the surface of biomaterials.^{52,53} Significant differences of inflammation degree between the two BC groups were observed only at 1 and 4 weeks (Figure 8). However, at 8, 16 and 32 weeks, no differences were observed. Although the adhesion peptide (RGD) present on BC membranes (group 2) could potentially interact with monocytes/macrophages (these cells express $\alpha_v\beta_3$ integrin),⁵³ influencing the adhesion and chemotaxis of these cells, a more intense infiltration of inflammatory cells was not observed.

In this study, BC and BC treated with the recombinant protein presented an irritant ranking of 5.5 and 3.0, respectively; thus both groups were slightly irritating to the tissue compared to the negative control sample (ePTFE).

In the study by Mårtson et al.,⁵⁴ a mild FBR was observed at 16 weeks post implantation by an implanted cellulose sponge (Cellspan®) in the subcutaneous tissue of rats from 1 to 60 weeks. This is in agreement with the observation made in the present study. At the latter stages of the current assay (16 and 32 weeks), a change in the shape of the membrane was observed, which may be assigned to similar events, but our data do not allow an objective position regarding the possible degradation of the BC implants.

Only a few studies have addressed the *in vivo* biocompatibility of BC, however most were with small animals and over a short period of time.^{20,27–29} Consequently, the different results obtained until now with BC implants may be explained by the different animal species used as well as the different methodologies used in assessing the inflammatory reaction. Overall, from the present work, a classification of BC as a biocompatible material may be drawn. However, acceptable tissue compatibility in one implantation site may not be favourable in another site. Thus, to employ BC as a biomedical scaffold for artificial blood vessels requires additional compatibility studies, in which the BC is subjected to the environment that exists in the grafting site in the vasculature.

Table 2. Scores attributed to the level of giant cells¹, fibrosis² and neovascularisation³ at 1, 2, 4, 8, 16 and 32 weeks after implantation

Event	Weeks					
	1	2	4	8	16	32
Giant cells						
ePTFE	0 ⁴ (0/0) ^{5a}	0.8 (0/2) ^a	0.4 (0/1) ^a	0 (0/0) ^a	0 (0/0) ^a	1 (0/2) ^a
Group 1	0 (0/0) ^a	1 (1/1) ^a	1.5 (1/2) ^a	0 (0/0) ^a	0 (0/0) ^a	2 (2/2) ^a
Group 2	0 (0/0) ^a	1.75 (1/3) ^a	0.5 (0/1) ^a	0 (0/0) ^a	1 (1/1) ^b	1 (1/1) ^a
Fibrosis						
ePTFE	1.8 (1/2) ^a	3.2 (2/4) ^a	1.8 (1/2) ^{ab}	1 (1/1) ^a	1.2 (1/2) ^a	2.4 (1/4) ^a
Group 1	1.5 (1/2) ^a	1.25 (1/2) ^b	1 (1/1) ^a	0 (0/0) ^b	1 (1/1) ^a	1 (1/1) ^a
Group 2	1.5 (1/2) ^a	1 (1/1) ^b	2.5 (2/3) ^b	0 (0/0) ^b	1 (1/1) ^a	1 (1/1) ^a
Neovascularisation						
ePTFE	2.4 (1/4) ^a	3.2 (3/4) ^a	2.4 (2/3) ^a	2.8 (2/3) ^a	3 (3/3) ^a	3 (2/4) ^a
Group 1	3 (2/4) ^a	2.5 (2/3) ^{ab}	4 (4/4) ^b	1 (1/1) ^b	2 (1/3) ^a	2 (2/2) ^a
Group 2	2.5 (2/3) ^a	1.5 (1/2) ^b	2 (2/2) ^a	1 (1/1) ^b	2.5 (1/4) ^a	1.5 (1/2) ^a

^{1,2}Score: absent (0), rare (1), mild (2), moderate (3), severe (4).²Score: absent (0), narrow band (1), moderately thick band (2), thick band (3), extensive band (4).⁴Mean score of analysis.⁵The number inside parenthesis represents the minimal and the maximal score observed in the event.For each event, values followed by different letters (a or b) on columns were significantly different ($P < 0.05$).

Conclusion

It was found that BC triggers a biological reaction typical of high surface-to-volume implants with an acute/subacute inflammatory reaction after 1 week post implantation that advanced to a mild chronic inflammation that was confined to the implantation site and associated with neovascularisation. The presence of giant cells was observed at latter time periods as well as narrow fibrous capsule surrounding the implant. There were no significant differences in the degree of inflammation between the BC coated with the recombinant protein RGD-CBM and the native BC. The BC implants were considered slightly more irritating to the tissue compared to the negative control sample (ePTFE). Based on CryoSEM analysis, the BC tubes have a denser luminal side and a porous outer side and non-oriented fibril network. In addition to increasing cell adhesion, the presence of RGD stimulated cellular elongation with an even cell distribution, while cells on untreated BC were round and tended to form aggregates. Mechanically, the small-diameter BC tubes had elasticity higher than human arteries and veins. Thus, BC could be used as a biomedical scaffold for artificial blood vessels but requires additional compatibility studies.

Funding

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors – COMPETE and National Funds through FCT – Foundation for Science and Technology under the Strategic Project PEst-C/AGR/UI0115/2011, the project PTDC/EBB-EBI/112170/2009 and under the PhD grant reference SFRH/BD/64838/2009. This work was also supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Ministério da Educação e da Ciência, Portugal, through the research Project PTDC/DES/104036/2008 and by QREN No. 1372 para Criação de um Núcleo I&DT para Desenvolvimento de Produtos nas Áreas de Medicina Regenerativa e de Terapias Celulares – Núcleo Biomat & Cell.

Acknowledgements

Fábia K. Andrade is the recipient of a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). Fábia K. Andrade and Nuno Alexandre contributed equally to this work.

References

1. Langer R and Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920–926.
2. Campbell JH, Efendy JL and Campbell GR. Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res* 1999; 85: 1173–1178.
3. Chue WL, Campbell GR, Caplice N, et al. Dog peritoneal and pleural cavities as bioreactors to grow autologous vascular grafts. *J Vasc Surg* 2004; 39: 859–867.
4. König G, McAllister TN, Dusserre N, et al. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials* 2009; 30: 1542–1550.
5. L'Heureux N, Dusserre N, König G, et al. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med* 2006; 12: 361–365.
6. L'Heureux N, Germain L, Labbe R, et al. In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. *J Vasc Surg* 1993; 17: 499–509.
7. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, et al. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 1998; 12: 47–56.
8. Andrade FK, Pertile RAN, Dourado F, et al. Bacterial cellulose: properties, production and applications. In: Lejeune A and Deprez T. (eds) *Cellulose: structure and properties, derivatives and industrial uses*. Nova Science Publishers, Inc., 2010 Hauppauge, NY, USA, pp.427–458.
9. Oliveira RCB, Souza FC and Castro M. Avaliação da resposta tecidual quando da substituição da cartilagem do septo nasal de coelhos por manta de celulose bacteriana. Estudo experimental. *ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia* 2007; 25: 267–277.
10. Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials* 2005; 26: 419–431.
11. Fontana JD, De Souza AM, Fontana CK, et al. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol* 1990; 24–25: 253–264.
12. Pippi NL and Sampaio AJSA. Estudos preliminares sobre o comportamento do Biofill na ceratoplastia lamelar em coelhos. *Cienc Rural* 1990; 20: 297–302.
13. Lin Y, Chen K, Ou K, et al. Effects of different extracellular matrices and growth factor immobilization on biodegradability and biocompatibility of macroporous bacterial cellulose. *J Bioact Compat Polym* 2011; 6: 508–518.
14. dos Anjos B, Novaes AB Jr, Meffert R, et al. Clinical comparison of cellulose and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of class II furcations in mandibular molars with 6-month re-entry. *J Periodontol* 1998; 69: 454–459.
15. Novaes AB Jr and Novaes AB. Bone formation over a TiAl6V4 (IMZ) implant placed into an extraction socket in association with membrane therapy (Gengiflex). *Clin Oral Implants Res* 1993; 4: 106–110.
16. Novaes AB Jr and Novaes AB. Immediate implants placed into infected sites: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995; 10: 609–613.
17. Novaes AB Jr and Novaes AB. Soft tissue management for primary closure in guided bone regeneration: surgical technique and case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12: 84–87.
18. Novaes AB Jr, Novaes AB, Grissi MFM, et al. Gengiflex, an alkali-cellulose membrane for GTR: histologic observations. *Braz Dent J* 1993; 4: 65–71.
19. Salata LA, Craig GT and Brook IM. In-vivo evaluation of a new membrane (Gengiflex) for guided bone regeneration. Divisional abstracts: The British society of Dental Research. *J Dent Res* 1995; 74: 825.
20. Sonohara MK and Greggi SLA. Avaliação da resposta biológica a diferentes barreiras mecânicas, utilizadas na técnica de regeneração tecidual guiada (RTG). *J Appl Oral Sci* 1994; 2: 96–102.
21. Brancher JA and Torres MF. Reparação microcirúrgica de nervo facial de ratos Wistar por meio de sutura – Parte II. *Rev Sul-Bras Odontol* 2005; 2: 34–38.
22. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, et al. Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* 2001; 26: 1561–1603.
23. Chen YM, Xi T, Zheng Y, et al. In vitro cytotoxicity of bacterial cellulose scaffolds used for tissue-engineered bone. *J Bioact Compat Polym* 2009; 24: 137–145.
24. Zaborowska M, Bodin A, Bäckdahl H, et al. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. *Acta Biomater* 2010; 6: 2540–2547.

25. Andrade FK, Costa R, Domingues L, et al. Improving bacterial cellulose for blood vessel replacement: functionalization with a chimeric protein containing a cellulose-binding module and an adhesion peptide. *Acta Biomater* 2010; 6: 4034–4041.
26. Backdahl H, Helenius G, Bodin A, et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials* 2006; 27: 2141–2149.
27. Esguerra M, Fink H, Laschke MW, et al. Intravital fluorescent microscopic evaluation of bacterial cellulose as scaffold for vascular grafts. *J Biomed Mater Res A* 2010; 93: 140–149.
28. Helenius G, Backdahl H, Bodin A, et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A* 2006; 76: 431–438.
29. Mendes PN, Rahal SC, Pereira-Junior OC, et al. In vivo and in vitro evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair. *Acta Vet Scand* 2009; 51: 12.
30. Pertile RA, Moreira S, Costa RM, et al. Bacterial cellulose: long-term biocompatibility studies. *J Biomater Sci Polym Ed* 2012; 23: 1339–1354.
31. Wippermann J, Schumann D, Klemm D, et al. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009; 37: 592–596.
32. Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, et al. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* 2007; 8: 1–12.
33. Andrade FK, Moreira SM, Domingues L, et al. Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD. *J Biomed Mater Res A* 2010; 92: 9–17.
34. Putra A, Kakugo A, Furukawa H, et al. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface. *Polymer* 2008; 49: 1885–1891.
35. Backdahl H, Esguerra M, Delbro D, et al. Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2: 320–330.
36. Bodin A, Backdahl H, Fink H, et al. Influence of cultivation conditions on mechanical and morphological properties of bacterial cellulose tubes. *Biotechnol Bioeng* 2007; 97: 425–434.
37. Sanchavanakit N, Sangrungrangroj W, Kaomongkolgit R, et al. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. *Biotechnol Prog* 2006; 22: 1194–1199.
38. McKenna BA, Mikkelsen D, Wehr JB, et al. Mechanical and structural properties of native and alkali-treated bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Cellulose* 2009; 16: 1047–1055.
39. Pukacki F, Jankowski T, Gabriel M, et al. The mechanical properties of fresh and cryopreserved arterial homografts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; 20: 21–24.
40. Purinya BA, Knets IV and Kas'yanov VA. Autogenous vein transplants in reconstructive vascular surgery. *Mech Compos Mater* 1975; 11: 133–138.
41. Martins CL. Appendix B: Properties of soft Materials. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, et al. (eds) *Biomaterial science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. London: Academic press, 2004, pp. 819–820.
42. Heilshorn SC, Liu JC and Tirrell DA. Cell-binding domain context affects cell behavior on engineered proteins. *Biomacromolecules* 2005; 6: 318–323.
43. Kurihara H and Nagamune T. Cell adhesion ability of artificial extracellular matrix proteins containing a long repetitive Arg-Gly-Asp sequence. *J Biosci Bioeng* 2005; 100: 82–87.
44. Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, et al. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys J* 2007; 92: 2964–2974.
45. Singer I, Kazazis DM and Scott S. Scanning electron microscopy of focal contacts on the substratum attachment surface of fibroblasts adherent to fibronectin. *J Cell Sci* 1989; 93(Pt 1): 147–154.
46. Hood JD and Cheres DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 91–100.
47. Gallin JI and Synderman R. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 1999, p. 1335.
48. Johnston RB Jr. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 1988; 318: 747–752.
49. Rae T. The macrophage response to implant materials – with special reference to those used in orthopedics. *Crit Rev Biocompat* 1986; 2: 97–126.
50. Greisler H. Macrophage-biomaterial interactions with bioresorbable vascular prostheses. *ASAIO Trans* 1988; 34: 1051–1059.
51. Babensee JE, Anderson JM, McIntire LV, et al. Host response to tissue engineered devices. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 33: 111–139.
52. Anderson JM, Gristina AG, Hanson SR, et al. Host reactions to biomaterials and their evaluation In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, et al. (eds) *Biomaterial science: an introduction to materials in medicine*. London: Academic press, 1996, pp. 171.
53. Anderson JM, Rodriguez A and Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008; 20: 86–100.
54. Martson M, Viljanto J, Hurme T, et al. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat. *Biomaterials* 1999; 20: 1989–1995.

1.3. Artigo 2

Journal of Biomedical Materials Research Part A (2014) (*In press*)

**BIOCOMPATIBILITY AND HEMOCOMPATIBILITY OF POLYVINYL ALCOHOL
HYDROGEL USED FOR VASCULAR GRAFTING – *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDIES.**



Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting—*In vitro* and *in vivo* studies

Nuno Alexandre,^{1,2} Jorge Ribeiro,^{3,4} Andrea Gärtner,^{3,4} Tiago Pereira,^{3,4} Irina Amorim,^{5,6} João Fragoso,¹ Ascensão Lopes,⁷ João Fernandes,^{8,9} Elísio Costa,^{8,10} Alice Santos-Silva,^{8,10} Miguel Rodrigues,⁷ José Domingos Santos,⁷ Ana Colette Maurício,^{3,4} Ana Lúcia Luís^{3,4}

¹Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora (UE), Pólo da Mitra, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

²Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora (UE), Pólo da Mitra, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

³Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares (ICETA), Rua D. Manuel II, Apartado 55142, 4051-401 Porto, Portugal

⁴Departamento de Clínicas Veterinárias, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto (UP), Rua de Jorge Viterbo Ferreira, n° 228, 4050-313 Porto, Portugal

⁵Departamento de Patologia e de Imunologia Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto (UP), Rua de Jorge Viterbo Ferreira, n° 228, 4050-313 Porto, Portugal

⁶Instituto Português de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), Rua Dr. Roberto Frias s/n, 4200-465 Porto, Portugal

⁷CEMUC, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais, Faculdade de Engenharia da, Universidade do Porto, s/n, 4200-465 Porto, Portugal

⁸Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto (UP), Rua do Campo Alegre, n° 823, 4150-180 Porto, Portugal

⁹Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (IBILI), Universidade de Coimbra (UC), Azinhaga Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra, Portugal

¹⁰Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto (UP), Rua de Jorge Viterbo Ferreira, n° 228, 4050-313 Porto, Portugal

Received 15 January 2014; accepted 21 January 2014

Published online 00 Month 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.35098

Abstract: Polyvinyl alcohol hydrogel (PVA) is a synthetic polymer with an increasing application in the biomedical field that can potentially be used for vascular grafting. However, the tissue and blood–material interactions of such gels and membranes are unknown in detail. The objectives of this study were to: (a) assess the biocompatibility and (b) hemocompatibility of PVA-based membranes in order to get some insight into its potential use as a vascular graft. PVA was evaluated isolated or in copolymerization with dextran (DX), a biopolymer with known effects in blood coagulation homeostasis. The effects of the mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from the umbilical cord Wharton's jelly in the improvement of PVA biocompatibility and in the vascular regeneration were also assessed. The biocompatibility of PVA was evaluated by

the implantation of membranes in subcutaneous tissue using an animal model (sheep). Histological samples were assessed and the biological response parameters such as polymorphonuclear neutrophilic leucocytes and macrophage scoring evaluated in the implant/tissue interface by International Standards Office (ISO) Standard 10993-6 (annex E). According to the scoring system based on those parameters, a total value was obtained for each animal and for each experimental group. The *in vitro* hemocompatibility studies included the classic hemolysis assay and both human and sheep bloods were used. Relatively to biocompatibility results, PVA was slightly irritant to the surrounding tissues; PVA-DX or PVA plus MSCs groups presented the lowest score according to ISO Standard 10993-6. Also, PVA was considered a

Correspondence to: N. Alexandre; e-mail: nmla@uevora.pt

Contract grant sponsor: QREN I&DT Cluster in Development of Products for Regenerative Medicine and Cell Therapies (Projects Biomat & Cell QREN 2008); contract grant number: 1372

Contract grant sponsor: European Community FEDER fund through North Portugal Regional Operational Program 2007–2013 (ON2—O Novo Norte)

Contract grant sponsor: Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Ministério da Educação e da Ciência and Program Project Euronanomed, Ref: EraNet—EuroNanoMed JTC2010; contract grant number: ENMED/0002/2010

Contract grant sponsor: Programa Operacional Factores de Competitividade (Program COMPETE); contract grant number: Project Pest-OE/AGR/UI0211/2011

Contract grant sponsor: Nuno Alexandre has a Doctoral Grant from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Ministério da Educação e da Ciência, Portugal; contract grant number: SFRH/BD/64838/2009

nonhemolytic biomaterial, presenting the lowest values for hemolysis when associated to DX. © 2014 Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part A: 00A:000–000, 2014.

Key Words: mesenchymal stem cells, vascular graft, polyvinyl alcohol hydrogel, hemocompatibility, biocompatibility, sheep model

How to cite this article: Alexandre N, Ribeiro J, Gärtner A, Pereira T, Amorim I, Fragoso J, Lopes A, Fernandes J, Costa E, Santos-Silva A, Santos JD, Maurício AC, Luís AL. 2014. Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting—*In vitro* and *in vivo* studies. J Biomed Mater Res Part A 2014;00A:000–000.

INTRODUCTION

According to studies reported by the World Health Organization, one of the leading causes of death are diseases caused by arterial obstruction.¹ The development of synthetic grafts for vessel replacement has been extensively studied in the last decades both as concerning the design of existing materials or the development of new synthetic materials.² Biomedical devices are required to be studied in terms of biocompatibility and hemocompatibility before pre-clinical and clinical application as vascular grafts, according to standards from International Standards Office (ISO) and Federal and Drug Administration. It is known that the surgical implantation of these devices results always in tissue injury that can lead to inflammation and/or biointegration. The assessment of hemocompatibility is a key aspect for medical devices such as artificial vascular grafts that contact directly and continuously with blood. The degree of thrombogenicity of biomaterials used in the production of vascular grafts influence directly their function as a blood conduit due to the formation of thrombus and consequently the magnitude of their patency rate. According to the ISO standard 10993-4, hemocompatibility is also evaluated by *in vitro* tests that point in evidence the blood-biomaterial interaction before their use in animal models. Hemocompatibility describes the response of a material when contacts with the blood of the host. A compatible response of the host can be different for the same material in different applications; it can include clotting, although this extreme response is not normally considered blood-compatible. However, the healing of a vascular graft is vastly facilitated, if a fibrin coating forms on the lumen of the graft at the anastomosis.³ Poor hemocompatibility is related to a biomaterial-induced immunological and inflammatory responses including activation of coagulation and complement systems. As a direct result of the activation of the former systems, several side effects were observed, including anaphylactic reactions, increased risk of clot formations, acute or chronic inflammation, infection, tumorigenesis, material degradation, renal and pulmonary dysfunction as well as encapsulation and loss of function of the device. The assessment of blood compatibility has several degrees of importance but it is vital in devices that contact directly with blood for different periods of time, including short-term (as catheters), long-term (as heart valves and prosthetic vascular grafts) contact and in extracorporeal devices (as dialysis and cardiopulmonary bypass machine).

Almost immediately after implantation, devices acquire a layer of host protein derived from plasma or interstitial

fluid.⁴ However, this protein layer may be responsible for phagocyte attraction and activation on the surface of implants.⁵ At the implant–tissue interface three host blood proteins predominate: albumin, immunoglobulin G (IgG), and fibrinogen.⁶ The biomaterial surface and its physiochemical properties are determinant for the adsorption and denaturation of proteins such as fibrinogen.^{6,7} As a matter of fact, the fibrinogen has a key role in mediating the short-term accumulation of inflammatory cells on implanted biomaterials. The degree of inflammatory reaction is also influenced by the geometry of fibrinogen denaturation which is determinant to the exposure of pro-inflammatory epitopes.^{4,5} Biomaterials are known agonists of the complement system and leukocytes activation, both of them are the prelude of platelet activation and by consequence have a role in thrombosis. Besides inflammation, physiochemical properties of biomaterials also influence thrombosis that is a special kind of inflammation.⁸ Polyvinyl alcohol hydrogel (PVA) is a water-soluble synthetic polymer with an increasingly use in biomedical applications.⁹ It is produced by polymerization of vinyl acetate to poly(vinyl) acetate followed by hydrolysis of polyvinyl acetate to polyvinyl alcohol. PVA must be cross linked by physical or chemical methods in order to be useful for a wide variety of biomedical applications especially in the areas of medicine and pharmaceutical sciences. A hydrogel can be defined as a hydrophilic cross-linked polymer (network) which swells when placed in water or biological fluids.⁹ However, it remains insoluble in solution due to the presence of crosslinks. The PVA use has been extended to biomedical applications including contact lenses, wound dressings, local drug delivery systems, and catheters.^{10–12} More recently, other biomedical applications were tested under experimental conditions like vascular grafts, artificial meniscus, intervertebral disk prosthesis, and also as a vitreous substitute.^{13–16} PVA was also been used as a scaffold for biosynthetic cartilage.^{17,18} The basic concept of tissue engineering consists in the seeding of cells in a biodegradable scaffold impregnated or not with growth factors and/or cytokines.¹⁹ The use of extra-embryonic tissues as stem cell reservoirs for tissue engineering offer many advantages over both embryonic and adult stem cell sources. Most significantly, the comparatively large volume of extra-embryonic tissues and ease of physical manipulation theoretically increases the number of stem cells that can be isolated.^{20–23} These cells are capable of self-renewal with sustained proliferation *in vitro* and can differentiate into multiple mesodermal cells, including neuroglial-like

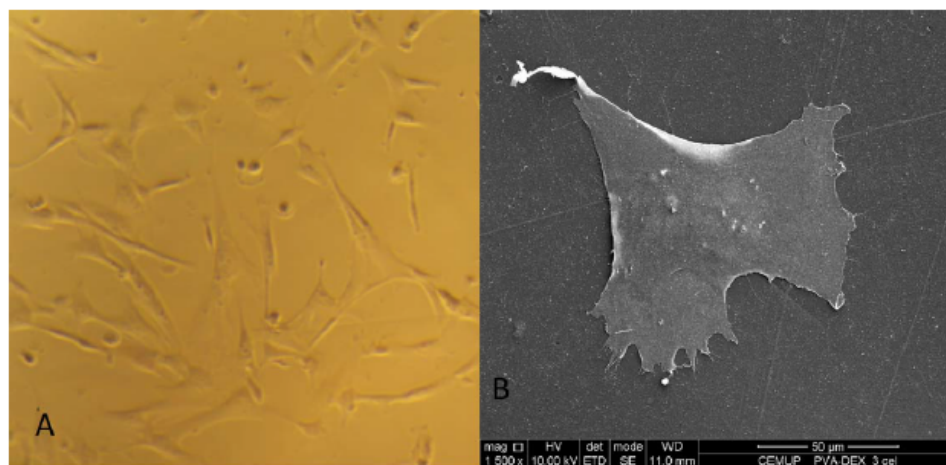


FIGURE 1. Monocultures of Human MSCs from Wharton's jelly exhibiting a mesenchymal-like shape with a flat polygonal morphology (A) ($\times 100$). SEM image of a MSC isolated from the Wharton's jelly of the umbilical cord cultured over a PVA with dextran disk (B) ($\times 1500$). MSCs phenotype was confirmed by flow cytometry before and showed that over 95% of the cells were positive for the cell surface markers CD44, CD73, CD90, and CD105 and less than 2% positive for CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, and HLA-DR. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

cells.^{20–23} The high plasticity and low immunogenicity of these cells turn them into a desirable form of cell therapy for the injured tissues without requiring the use of immunosuppressive drugs during the treatments.^{20–23} Through these immunosuppression properties of mesenchymal stem cells (MSCs), their association to vascular prosthetic surface fabricated of different biomaterials can allow a faster biointegration avoiding an exuberant local inflammatory reaction. For this reason, it was decided to evaluate the association of MSCs isolated from the umbilical cord (UC) Wharton's jelly with PVA in order to be used as a scaffold for vascular reconstruction in the sheep experimental model.

In this work, membranes of PVA were tested for biocompatibility and hemocompatibility using sheep as an experimental model. This work aimed to test a biomaterial, the PVA with the future prospect of producing vascular grafts. So far, PVA has been tested for biocompatibility in rats and in crab-eating macaques and there is a lack of information of the behavior of this biomaterial in other species.^{14,24,25} Additionally, MSCs from UC Wharton's jelly were cultivated on PVA membranes in order to study the cytocompatibility and the biointegration of the developed biomaterial associated to this cellular system when used *in vivo* in pre-clinical trials with sheep. To our knowledge, PVA gels prepared by freezing and thawing method were never been tested for biocompatibility and hemocompatibility. With the aim of improving biocompatibility and hemocompatibility, PVA was also tested in copolymerization with dextran (DX). DX is a polysaccharide, which is a biopolymer molecule with multiple effects in blood coagulation homeostasis including platelet activation inhibition,²⁶ diminished fibrin polymerization,²⁷ decreased blood viscosity, and erythrocyte rouleaux formation,²⁸ that might improve hemocompatibility if associated to other biomaterials like PVA.²⁹

MATERIALS AND METHODS

Preparation of PVA membranes

PVA cryogels were fabricated by a two-step gelation procedure involving a freeze/thaw cycle. A 20% PVA solution was prepared in distilled water at 80°C for several hours to achieve homogeneity. In order to remove air bubbles, the former solution was immersed in an ultrasound bath for 30 min. Solutions were poured into several polystyrene Petri dishes used as a mold of 500 µm thickness. The membranes were subjected to three freeze/thaw cycles which leads to cryogel formation by physical reticulation. The freezing was done in a refrigerator at -28°C while the thawing process was done in an incubator at 25°C . After the initial gels were obtained, 3 cm pieces of the gel were cut and further reinforced physically by immersing in a solution of 1M KOH and 1M Na_2SO_4 at room temperature under constant mixing for 1 h and afterward rinsing with distilled water.

Preparation of PVA-dextran membranes

For the production of PVA membranes modified with DX (Sigma Aldrich®, molecular weight: 64,000–76,000 Da, St. Louis, USA) [Fig. 1(B)], two solutions were mixed, one solution of PVA at 20% (w/v) with a solution of DX at 1% (w/v). The final mixture was made using the proportion DX to PVA at 10/90 (v/v). The DX solution was added to the PVA solution when the PVA powder was completely dissolved. After the final solution was completed, it was immersed in an ultrasound bath for 30 min for removing air bubbles. Physical reticulation with three cycles was used, followed by the annealing process for the production of PVA/DX membranes. The PVA/DX membranes were immersed in a NaOH solution followed by the hydration in distilled water.

MSCs culture on PVA membranes

MSCs from Wharton's jelly UC matrix were purchased from PromoCell GmbH (C-12971, lot-number: 8082606.7). The MSCs were cultured and maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. Mesenchymal Stem Cell Medium, PromoCell (C-28010), was replaced every 48 h. At 80% confluence, cells were harvested with 0.25% trypsin with EDTA (GIBCO) and passed into a new flask for further expansion. MSCs at a concentration of 10⁴ cells/cm² were cultured exhibiting an 80% confluence after 4 days on immersed PVA membranes in culture medium [Fig. 1(A,B)]. The phenotype of MSCs was assessed by PromoCell assay. Rigid quality control tests were performed for each lot of PromoCell MSCs isolated from Wharton's jelly of UC. MSCs were tested for cell morphology, adherence rate, and viability. Furthermore, each cell lot was characterized by flow cytometry analysis for a comprehensive panel of markers, such as platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), homing cell adhesion molecule (CD44), CD45, and Endoglin (CD105). The MSCs exhibited a mesenchymal-like shape with a flat and polygonal morphology. During expansion, the cells became long spindle-shaped and colonized the whole culturing surface and PVA membranes [Fig. 1(A,B)]. The MSCs phenotype was confirmed by flow cytometry before *in vivo* testing. Detection was performed with the following antibodies and their respective isotypes (all from BioLegend unless stated otherwise): PE anti-human CD105 (eBioScience); APC anti-human CD73; PE anti-human CD90; PerCP/Cy5.5 anti-human CD45; FITC anti-human CD34; PerCP/Cy5.5 anti-human CD14; Pacific Blue anti-human CD19; and pacific-blue anti-human HLA-DR. Chromosome analysis on MSCs cell line from Wharton's jelly before *in vivo* application was carried out between passages 4 and 5. When 80% confluence was reached, culture medium was changed and supplemented with 4 µg/mL colcemid solution (stock solution, Cat. n.º. 15212-012, Gibco, NY). After 4 h, cells were collected and suspended in 8 mL of 0.075M KCl solution supplemented with bovine fetal serum. Then, the suspension was incubated in 37°C for 35 min. After centrifugation (1500 rpm), 8 mL of the fixative methanol: glacial acetic acid at 6:1 was added and mixed together, and the cells were again centrifuged. After two rounds of fixation, two new rounds were performed with the fixative methanol: glacial acetic acid at 3:1. After the last centrifugation, the cell suspension was spread onto very well cleaned slides. Chromosome analysis was performed by one scorer on 20 Giemsa-stained metaphases. Each cell was scored for chromosome number. Routine chromosome G-banding analysis was also carried out for determination of the karyotype. The karyotype of the MSCs was determined and no structural alterations were found demonstrating the absence of neoplastic characteristics in these cells, as well as chromosomal stability to the cell culture procedures.³⁰ Intracellular free Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) was measured in Fura-2-loaded MSCs cells by using dual wavelength spectrofluorometry as previously described.³¹ The measurements were performed on MSCs cultured on PVA-discs in order to correlate the MSCs survival capacity in the presence of the PVA.

Results obtained from epifluorescence technique are referred to measurements from MSCs which correspond to [Ca²⁺]_i from cells that did not begin the apoptosis process (data not shown). According to these results, it is reasonable to conclude that PVA is a viable substrate for undifferentiated MSCs vascular local delivery.

Scanning electron microscopy

Before scanning electron microscopy (SEM) analysis, the MSCs cultured on PVA disks [Fig. 1(B)] were first fixed with 1.5% glutaraldehyde in 0.14M sodium cacodylate buffer (pH 7.3) for 2 h at 4°C. Afterward, the PVA samples with and without the MSCs were dehydrated using graded ethanol solutions from 60% to 100%, 5 min each, and subjected to critical point drying. Finally, the samples were mounted on aluminum stubs using double-side adhesive tape and sputter coated with gold/palladium thin film, using the SPI Module Sputter Coater equipment for 100 s and with a 15 mA current. The SEM/EDS exam was performed using a High resolution (Schottky) Environmental Scanning Electron Microscope with X-Ray Microanalysis and Electron Backscattered Diffraction analysis: Quanta 400 FEG ESEM/EDAX Genesis X4M.

In vivo biocompatibility studies

Experimental groups. Thirty adult female white Merino sheep weighing ~60 kg were randomly divided into five groups of six animals each. The animals were kept in straw yard (4 m × 3 m) and were fed with standard chow and water *ad libitum*. A diurnal 12 h light/12 h dark cycle was used in this study. Adequate measures were taken to minimize pain and discomfort taking in account human endpoints for animal suffering and distress during the *in vivo* testing. All procedures were performed with the approval of the Veterinary Authorities of Portugal in accordance with the European Communities Council Directive of November 1986 (86/609/EEC).

One group of animals (Group 1) was subcutaneously implanted with PVA disks with 15.5 mm diameter; a second group (Group 2) was subcutaneously implanted with PVA disks covered with a confluent monoculture of human MSCs derived from Wharton's jelly. The third group was implanted with PVA/DX membranes with the same diameter. As required by the ISO Standard 10993-6, a negative control group (Group 4, sham) of six animals was included. The positive control group (Group 5) was subcutaneously implanted with expanded polytetrafluoroethylene disk samples (MAXIFLO™, ePTFE Vascular Prosthesis, Vascutek, Scotland) with an equivalent area of biomaterial to the PVA membranes implanted.

Surgical procedures. The animals were solids fastened for 48 h and liquids were also removed 2 h before the surgical procedure. The anesthetic protocol consisted in xylazine (0.2 mg/kg, intravenous) as tranquilizer. For inducing anesthesia, sodium thiopental was used at a dose of 15 mg/kg intravenous. The anesthetic maintenance was done with isoflurane at 2% via endotracheal intubation carried by 100%

oxygen with a flow of 2 L/min. The wool was clipped in roughly square areas and the skin was aseptically prepared with iodopovidone solution. The incisions were made over the dorsal area, starting over the last ribs and ending just cranially to the sacrum. These 3 cm length incisions, three on the left side and two on the right one, were made parallel and 4 cm off the dorsal midline. A minimum distance of 3 cm was kept between incisions. The disks samples were inserted under the skin, subcutaneously, distally to the midline. Subsequently, the skin was closed with a Supramid® USP1 suture and the ewes were transferred to straw yards (4 m × 3 m) after surgery. For the sham surgery, the surgical technique was performed exactly as previously described with the exception of the disk implantation. The skin sutures were not removed in order to localize the correct implant site.

Retrieval of implants and histological evaluation. The implants and the surrounding tissue were collected after a peripheral infiltration with 2% lidocaine, at 1, 2, 4, 8, 16, and 32 weeks postimplantation. Five samples were collected in each animal, randomly selected in each experimental group at the previously reported temporal points. The samples were fixed in 10% formalin, paraffin-embedded, cut in 2 µm and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological evaluation.

The biological response parameters were assessed in the implant/tissue interface with three high power fields (400×) by at least two experienced pathologists, for each sample and recorded in an appropriated formulary. When there was a divergence of opinion, an agreed diagnosis was reached by using a multihead microscope. Among the biological response parameters, all were evaluated according to the ISO standard 10993-6 (annex E) and included: the extent of fibrosis/fibrous capsule (layer in micrometers) and inflammation; the degeneration as determined by changes in tissue morphology; the number and distribution from the material/tissue interface of the inflammatory cell types, namely polymorphonuclear neutrophilic leucocytes (PMN), lymphocytes, plasma cells, eosinophils, macrophages, and multinucleated cells; the presence, extent, and type of necrosis; other tissue alterations such as vascularization, fatty infiltration, and granuloma formation; the material parameters such as fragmentation and/or debris presence, form and location of remnants of degraded material. According to the scoring system based on the mentioned parameters, a total value was obtained for each animal and for each experimental group. The group value was subtracted to the control group value and the test sample was considered as follows: Nonirritant (0.0 up to 0.9), slight irritant (3.0 up to 8.9), moderate irritant (9.0 up to 15.0), and severe irritant (>15), to the tissue as compared with the control sample-irritant. Adverse histological responses were documented by photomicrograph. The collected data was submitted to statistical analyses.

***In vitro* hemocompatibility studies**

The *in vitro* hemocompatibility studies followed the Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials from the American Society for Testing and

Materials (ASTM F756-00, 2000), and comprehended the classic hemolysis assay determination. According with the mentioned standard, a material is considered nonhemolytic if the hemolytic index is inferior to 2%, slightly hemolytic if between 2% and 5% and hemolytic if that value is over 5%. Three blood samples of healthy sheep and humans volunteers were collected in sodium citrate tube. For each blood sample, assays were made in duplicate. The PVA samples tested were: PVA, PVA plus 1% DX, PVA plus 10% DX, and as positive control, disks of expanded ePTFE (MAXIFLO™ ePTFE Vascular Prosthesis, Vascutek, Scotland) were used. For the negative control, blood of sheep or human was used. Before assay procedures, membranes were disinfected by immersion in ethanol 70% (v/v) for 5 min followed by generous rinse with physiologic saline 0.9%. Both types of blood (human and sheep) were diluted in phosphate buffered saline, pH 7.4, aiming to a concentration of 8 g/dL of hemoglobin. Following blood dilution, the different biomaterial samples and both controls were placed in contact with blood in six-well plates (in duplicate). The plates were shaken every other hour and incubated at 37°C for 3 h. At the end of this period, the bloods were removed from the plates and centrifuged (Thermo Electron Corporation, Jouan Br4i multifunction centrifuge) at 4000 rpm for 5 min at 4°C. The supernatant of each centrifuged tube was removed with the help of micropipette and transferred for a 96 wells plate. Hemolysis was then spectrophotometrically (Bio Tek®, Power wave XS) determined according to Ko et al.³² by means of a calibration curve (absorbance vs. hemoglobin) obtained as follows: a calibration curve plotting absorbance (at 540 nm) against hemoglobin was prepared by diluting 1:100 the 8 g/dL hemoglobin initial suspension in distilled water to induce total hemolysis; with this dilution, a concentration of 80 mg/dL was obtained; by performing eight consecutive double dilutions with water, it was made a set of seven lysates standards with values between 800 and 12.5 mg/L; the absorbance of each solution was read at 540 nm, using water as blank.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using the SPSS version 19.0 (SPSS, Chicago, IL). Results are presented as mean ± SD. Multiple comparisons between groups were performed by one-way ANOVA supplemented with Tukey's HSD *post hoc* test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

The complications associated to medical devices are largely associated to material-tissue adverse reactions including both the effects of the implant on the host tissues, as well as the effects of the host tissues on the implant. As a promising material for small caliber vascular grafts, PVA was evaluated in terms of its *in vivo* biocompatibility and hemocompatibility. The effects of the MSCs isolated from the UC Wharton's jelly and DX in the improvement of PVA biocompatibility and biointegration were also assessed. MSCs, as

TABLE I. Scores^a Attributed to the Level of PMN, Macrophage, Lymphocyte, Giant Cells, Fibrosis, and Neovascularization at 1, 2, 4, 8, 16, and 32 Weeks After Implantation

	Weeks ^{a,b}					
	1 (n = 5)	2 (n = 5)	4 (n = 5)	8 (n = 5)	16 (n = 5)	32 (n = 5)
PMN						
Group 1 (PVA)	2.8 (2,3)	2.4 (2,3)	1.4 (1,2)	1.4 (1,2)	1 (1,1)	0.2 (0,2)
Group 2 (PVA + MSCs)	2.6 (1,4)	1.2 (0,2)	1 (0,2)	1 (0,2)	1 (0,1)	0 (0,0)
Group 3 (PVA + dextran)	2.8 (2,3)	0.8 (0,1)	1 (1,1) ^c	1.4 (1,3)	1 (0,2)	0.2 (0,1)
Group 4 (sham)	3.6 (3,4)	1.2 (0,2)	0.2 (0,1)	1.4 (1,3)	0 (0,0)	0.2 (0,1)
Group 5 (ePTFE)	1.8 (1,2) ^e	1.6 (0,3)	0.2 (0,1) ^c	0 (0,0)	0.4 (0,1)	1 (0,2)
Macrophage						
Group 1 (PVA)	1.2 (1,2)	2.6 (2,3)	3.6 (3,4)	3 (2,4)	3 (0,4)	2 (1,2)
Group 2 (PVA + MSCs)	1.2 (1,2)	3.6 (3,4) ^c	3 (2,4)	2 (1,3) ^c	2 (1,3)	2 (1,3)
Group 3 (PVA + dextran)	2.8 (2,3) ^{c,d}	2 (1,3) ^{c,d}	2 (1,2) ^{c,d}	2.6 (2,3) ^c	2.4 (1,3)	1.4 (1,2) ^{c,d}
Group 4 (sham)	0 (0,0) ^{c,d,e}	1 (1,1) ^{d,e}	0 (0,0) ^{c,d,e}	1 (0,3) ^{d,e}	0 (0,0)	2 (1,3)
Group 5 (ePTFE)	1.2 (1,2) ^{e,f}	1.8 (1,3) ^d	1 (1,1) ^{c,d,e,f}	0 (0,0) ^{c,f}	0.6 (0,2)	0.8 (0,2)
Lymphocyte						
Group 1 (PVA)	2 (1,2)	1 (1,1)	2.2 (2,3)	2.4 (2,3)	3.2 (3,3)	2.2 (1,3)
Group 2 (PVA + MSCs)	2.2 (1,4)	2 (1,4)	1.6 (1,2)	2 (1,2) ^c	1 (1,2) ^c	2 (1,3)
Group 3 (PVA + dextran)	2.6 (2,3)	2 (1,3) ^c	2 (1,3)	1.6 (1,2) ^d	2.4 (2,3) ^d	1.6 (1,2) ^c
Group 4 (sham)	1.6 (1,2)	2.2 (1,3)	1.4 (1,2)	2.6 (2,3) ^e	1.4 (1,2) ^d	2.2 (1,3)
Group 5 (ePTFE)	2.2 (1,3)	1.4 (1,2)	1.2 (1,2)	1.2 (1,2) ^{c,e}	2 (1,3) ^{c,e}	2 (1,3)
Giant cells						
Group 1 (PVA)	0 (0,0)	1 (1,2)	1.4 (0,2)	1.4 (0,3)	1.4 (0,3)	0 (0,0)
Group 2 (PVA + MSCs)	0.4 (0,1)	1.2 (0,2)	1.8 (1,3)	1 (0,2)	1 (0,3)	1 (0,3)
Group 3 (PVA + dextran)	0.4 (0,2)	0.2 (0,1) ^{c,d}	0.4 (0,1) ^{c,d}	0.2 (0,1) ^c	0.4 (0,1)	0 (0,0)
Group 4 (sham)	0 (0,0)	0 (0,0) ^c	0 (0,0) ^d	0 (0,0) ^c	0 (0,0)	0 (0,0)
Group 5 (ePTFE)	0 (0,0)	0.8 (0,2)	0.4 (0,1) ^d	0 (0,0) ^c	0 (0,0)	1 (0,2)
Fibrosis						
Group 1 (PVA)	1.2 (1,2)	0.8 (0,1)	1.8 (1,2)	1 (1,1)	0 (0,0)	1 (1,1)
Group 2 (PVA + MSCs)	1.8 (1,4)	0 (0,0)	2.4 (2,3)	2 (1,3) ^c	0 (0,1)	1 (0,1)
Group 3 (PVA + dextran)	0.6 (0,1)	0.8 (0,1)	0.6 (0,1) ^{c,d}	0.8 (0,1) ^{c,d}	1.2 (1,2) ^{c,d}	1 (1,1)
Group 4 (sham)	1 (1,1)	0.6 (0,1)	0 (0,0) ^{c,d}	0 (0,0) ^{c,d,e}	0 (0,0) ^e	1 (1,1)
Group 5 (ePTFE)	2 (1,2)	3.2 (2,4) ^{c,d,e,f}	1.8 (1,2) ^{e,f}	1 (1,1) ^{d,e}	1.2 (1,2) ^{c,d,e}	2.4 (1,4)
Neovascularization						
Group 1 (PVA)	3 (3,3)	2.8 (2,4)	2.6 (2,3)	2.8 (2,3)	2.6 (2,3)	2.4 (2,3)
Group 2 (PVA + MSCs)	3.2 (2,4)	3 (3,3)	2.2 (1,3)	3 (3,3)	2 (1,2)	2 (1,3)
Group 3 (PVA + dextran)	2 (2,2)	1.8 (1,2)	1.8 (1,2)	1.6 (1,2) ^d	2.6 (2,3)	2 (1,3)
Group 4 (sham)	2.4 (2,3)	2.8 (2,3) ^d	2 (1,3)	3.4 (3,4) ^{c,e}	2.4 (2,3)	2.4 (2,3)
Group 5 (ePTFE)	2 (1,4)	3.2 (3,4) ^f	2.4 (2,3)	2.8 (2,3) ^f	3 (3,3)	3 (2,4)

Score: absent (0), rare (1), mild (2), moderate (3), and severe (4).

PVA, polyvinyl alcohol hydrogel; MSCs, mesenchymal stem cells; ePTFE, expanded polytetrafluoroethylene.

^aThe number inside parenthesis represents the minimal and the maximal score observed in the event.^bMean score of analysis.^c $p < 0.05$ versus group 1.^d $p < 0.05$ versus group 2.^e $p < 0.05$ versus group 3.^f $p < 0.05$ versus group 4.

defined by the International Society for Cellular Therapy, are cells characterized by: (a) their capacity to adhere to plastic; (b) expression of specific surface markers, namely, CD73, CD90, and CD105, and no expression of CD14, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR.³³ The MSCs phenotype was confirmed by flow cytometry before *in vivo* testing. As expected for MSCs, flow cytometry analysis showed that over 95% of the cells in the population were consistently positive for the cell surface markers CD44, CD73, CD90, and CD105 and less than 2% positive for CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, and HLA-DR.

Considering the subcutaneous implants, the histological observation showed that at week 1 postimplantation there

was a predominance of PMN and macrophage infiltrate at the implant-tissue junction in both experimental group 1 (PVA), group 2 (PVA plus MSCs), group 3 (PVA Dex 1%), and in the control group (ePTFE), suggesting an acute/sub-acute inflammatory reaction (Table I). During the first 2 weeks, PMN and lymphocytes also prevailed over other inflammatory cells, in the histological analysis performed to the sham surgery group. In week 2 postimplantation, it was observed a significant increase in macrophages, plasma cells, and lymphocytes infiltration associated to a proliferation of small blood vessels, compatible with a sub-acute/chronic inflammation. The persistence of the inflammatory stimuli in the group 1, group 2, group 3, and control group

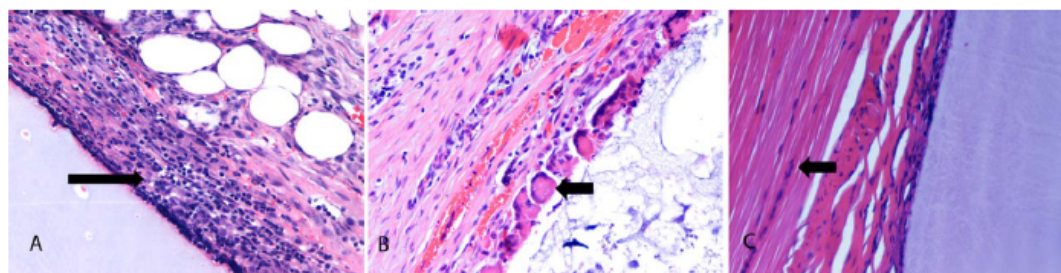


FIGURE 2. Persistence of the inflammatory stimuli (PVA membrane) led to a change from acute to chronic inflammation. Predominance of PMN (black arrow) at PVA-tissue interface, 1 week postimplantation (HE staining, $\times 200$) (A), proliferation of giant cells (black arrow) and neovessels at PVA-tissue interface (HE staining, $\times 200$) (B), the presence of fibrotic capsule (black arrow) at PVA-tissue interface, 32 weeks postimplantation (HE staining, $\times 200$) (C). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

led to a change from acute to chronic inflammation (Fig. 2). However, in the sham surgery group, the macrophage number showed a tendency to decrease (with the exception of the latest experimental point-32 weeks) probably due to the lack of antigenic stimuli. This chronic inflammation response was confined to the implantation site [Fig. 3(A)].

At week 4, the histological analysis revealed that the type of cell infiltration consisted mainly in macrophage and lymphocyte populations in all groups with the exception of the sham surgery group (Table I). From this time point forward, in groups 1 and 2, the multinucleated or giant cell number suffers an increase when compared with the previously time points. Concerning the other groups, giant cells were absent or rare during the 32 weeks. The type of cell infiltrate and the increased neovascularization, always surrounding the implant area were compatible with a chronic inflammation [Fig. 3(B)].

The foreign body reaction (FBR), consisting mainly of macrophages and/or foreign body giant cells infiltration at the tissue-implant interface associated to the different degrees fibrosis (i.e., fibrous encapsulation), was observed at latter periods (16 and 32 weeks) of the experimental process [Fig. 3(F,G)]. At the present work, the fibrosis grading in the PVA containing membranes varied between the absent (0) grade, to a mild (2) degree during the entire evaluated period of 32 weeks (Table I). Especially in the latest periods (16 and 32 weeks), the level of fibrosis was reduced to absent (0) or rare (1). In general, the PVA groups, particularly PVA-DX and PVA plus MSCs, presented an inferior level of fibrosis (0–2) when compared with commercial available ePTFE (1–3).

By the histological analysis of the different experimental groups here reported, the number of macrophage remained stable or showed a tendency to decrease, especially in group 2 where the PVA was associated to the cellular system (Table I). It was also observed a large number of neovasculatures, capillaries and venules, as well as fibrosis granulation tissue at the material-tissue interface reinforcing the good biocompatibility of PVA and this in agreement with our observations of new blood vessels around the implants in the longest temporal points (16 and 32 weeks) for groups 1, 2, and 3, evidencing the good biocompatibility of the biomaterial.

In this study, the neovascularization was similar to both PVA groups (PVA and PVA plus MSCs) and the ePTFE group; especially in latter periods (16 and 32 weeks) (Table I). In the first weeks, the cells colonizing the implants were mostly neutrophils and macrophages. However, over time, macrophages became predominant over neutrophils, and fibroblasts were the main cell types within the implants, although blood vessels were restricted to the implant's periphery. The FBR presented at tissue-PVA interface was very mild, particularly in group 3 (PVA-DX).

A more detailed analysis of the inflammation results over time showed us that PMN and lymphocyte prevailed in the first weeks (1 and 2), indicative of an acute/sub-acute inflammation. At the same time points, the observed necrosis (data not showed) could also be attributed to the traumatic injury of surgical procedure. Mild fibrosis and the absence of giant cells during the several time points are indicative of the inexistence of FBR linked to the absence of biomaterial at surgical site. The observation of blood vessels at the histologic samples evidenced moderate and stable amounts during the complete experimental period even at late periods. For that reason, the presence of blood vessels is probably connected to the intrinsic characteristics of subcutaneous connective tissue.

The results here presented showed that there is a tendency in the formation of a more intense fibrosis in late periods as opposed to the first weeks (1 and 2 weeks). There were significant differences between PVA-DX, PVA, and PVA plus MSCs groups reinforcing the effect of DX in reducing FBR. However, for the sham surgery group, this value was consistently and significantly lower during the 32 weeks period which was obviously related with the absence of the implant (Table I).

Analysis of the histological sections by light microscopy showed the maturation of the granulation tissue, with an inflammatory infiltrate mainly composed by PMNs and lymphocytes and no capsule at week 1 postimplantation, leading the formation of a mature fibrous capsule surround the implant and the presence of newly formed vessels at week 32 postimplantation.

The scoring values for inflammation under the conditions for this study presented values as slightly irritant

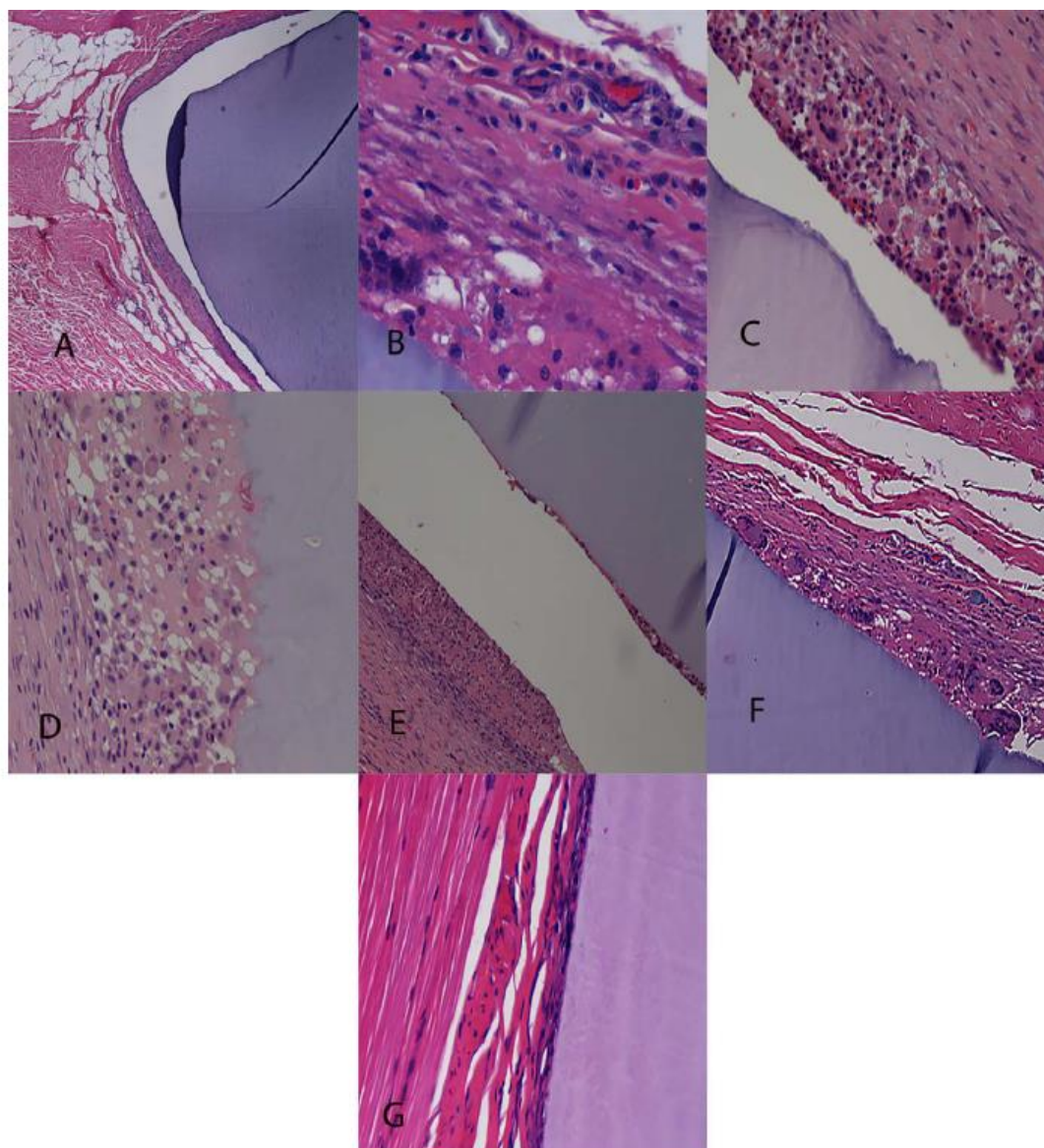


FIGURE 3. Chronic inflammation response (fibrotic capsule) locally confining the PVA membrane to the implantation site (HE staining, $\times 40$) (A). Cell infiltrate and increased neovascularization, surrounding the implant area compatible with a chronic inflammation (HE staining, $\times 400$) (B). At 4 (C) and 8 (D) weeks postimplantation, a more intense inflammation in the experimental groups 1 and 2 was observed (HE staining, (C) $\times 200$, (D) $\times 200$). Histological image showing proliferation of fibroblasts, macrophages, and vascular endothelial cells (granulation tissue) and a decrease in inflammatory cells such as PMN and lymphocytes at tissue–biomaterial interface, 4 weeks postimplantation (HE staining, $\times 100$) (E). Foreign body reaction consisting mainly of macrophages and/or foreign body giant cells infiltration at the tissue–implant interface associated to the different degrees fibrosis at 16 (F) and 32 (G) weeks postimplantation (HE staining, (F) $\times 100$ and (G) $\times 200$). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

(3.0–8.9) to nonirritant (0–2.9) (Table II). The biomaterials in three groups were considered slight irritant to the tissue as compared with the negative control sample (ePTFE). Even in the sham surgery group (in spite of the absence of the biomaterial), the achieved scoring value for inflammation was

1.3, despite being considered nonirritant confirms that the surgical procedure also has a role in the inflammation process of biomaterial implantation. At week 4 and week 8 postimplantation, a more intense inflammation in the experimental groups 1 and 2 was observed [Fig. 3(C,D)]. A marked

TABLE II. Mean Inflammatory Scores^a Over Experimental Points for the Several Experimental Groups

Groups	Weeks					Mean \pm SD of All Experimental Points
	1 (n = 5)	2 (n = 5)	4 (n = 5)	8 (n = 5)	16 (n = 5)	32 (n = 5)
Group 1 (PVA)	(20.8–20.4) 0.4	(21.8–20) 1.8	(21.6–11) 10.6	(20.2–7.8) 12.4	(21.8–12.4) 9.4	(13–17) 0
Group 2 (PVA + MSCs)	(18.6–20.4) 0	(20.2–20) 0.2	(20.6–11) 9.6	(17.7–0.8) 9.2	(10.6–12.4) 0 ^b	(14.2–17) 0
Group 3 (PVA + dextran)	(21.4–20.4) 1	(13.8–20) 0	(14.4–11) 3.4 ^{b,c}	(15.2–7.8) 7.4	(18.6–12.4) 6.2 ^b	(11–17) 0
Group 4 (Sham surgery)	(15.4–20.4) 0 ^d	(11.2–20) 0	(12–11) 1 ^d	(14.6–7.8) 6.8	(6–12.4) 0 ^d	(5.8–17) 0
Group 5 (ePTFE)	20.4	20	11	7.8	12.4	17

The number inside the parenthesis represents the difference between inflammatory score of control group (ePTFE) and the other experimental groups. PVA, polyvinyl alcohol hydrogel; MSCs, mesenchymal stem cells; ePTFE, expanded polytetrafluoroethylene, $n = 5$.

^aScore: Nonirritant (0.0 up to 0.9), slight irritant (3.0 up to 8.9), moderate irritant (9.0 up to 15.0), and severe irritant (>15).

^b $p < 0.05$ versus group 1.

^c $p < 0.05$ versus group 2.

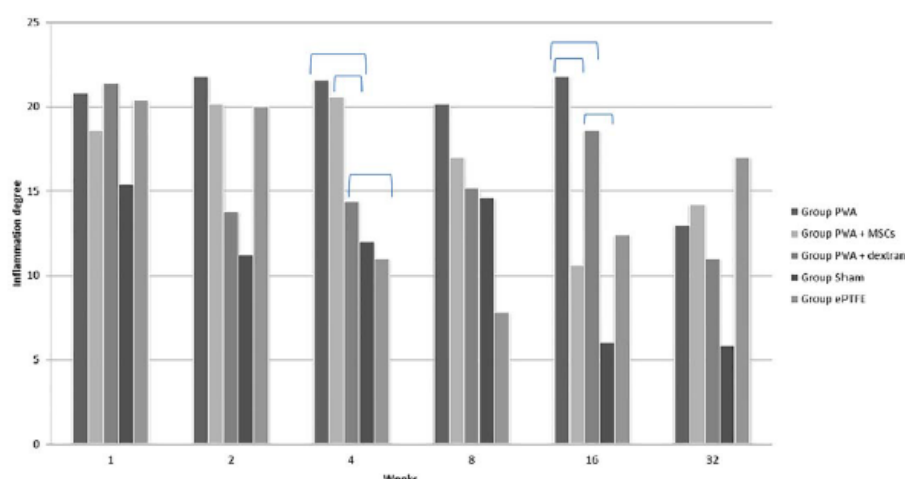
^d $p < 0.05$ versus group 3.

decrease in inflammation grading was detected in the several experimental and control groups at 8 weeks postimplantation onward (Table II). Although statistical significant differences ($p < 0.05$) were verified between group 2 (PVA plus MSCs) and group 1 (PVA) at week 16 (Graphic 1). It was also observed a statistically significant ($p < 0.05$) difference between group 3 and group 1/2 as concerns the inflammatory score at week 4 (Graphic 1). Also at week 16, the mean inflammatory score was statistically different ($p < 0.05$) between group 3 (PVA-DX) and group 1 (PVA) (Graphic 1). The overall mean inflammatory score was lower at group 2 (PVA-MSCs), group 3 (PVA-DX), and group 4 (sham). However, a statistically significant difference ($p < 0.05$) was observed between group 3 and group 1. This statistical evidenced was also verified between group 4 and group 1. Differences were also verified among the sham surgery group and group 3 (PVA-DX 1%) at latter experimental times. The histological results showed that none of the material tested induced intense reaction with the host. The PVA implants caused only a mild inflammatory reaction that was inferior to commercially available products (ePTFE) and that inflammatory reaction decreased along time (Table II).

A key component of biocompatibility of vascular grafts biomaterials is the assessment of their interaction with blood or hemocompatibility. The *in vitro* hemocompatibility studies developed in this work were based in the *in vitro* hemolysis test. The interaction of PVA with blood was tested using human and sheep blood. PVA was used isolated or in association with different concentrations (1% and 10%) of low molecular weight DX. The hemolytic index values (%) were consistently higher for isolated PVA in either humans (0.028) or sheep (0.656) when compared with PVA-DX in different percentages of incorporation (1% and 10%), (Table III). For positive control, it was used the ePTFE and the results for the hemolytic index using human (0.016%) and sheep (0.014%) blood were lower than PVA and higher than PVA-DX. PVA-DX presented the lowest value among the biomaterials tested in the presented work; more specifically, PVA-DX 1% exhibited a value of 0.001% in sheep and 0.002% in humans. In general, all the biomaterials tested in the reported experimental work were considered nonhemolytic according with ASTM F756-00 standard.

DISCUSSION

As expected in the first 2 weeks, that PMN and lymphocyte prevailed over other inflammatory cells at tissue-biomaterials interface indicative of an acute/sub-acute inflammation. From the first to the second week, the observed decrease in PMN values in all experimental groups can be explained by the transition from the acute to sub-acute inflammatory process (Table I). At the same time points, the observed necrosis (data not showed) could be attributed to the traumatic injury of the surgical procedure and to the introduction of biomaterial used for suturing. This event can also contribute to the inflammatory process apart from the biomaterials membranes. At later time points (from 4 week onward), the type of cell infiltrate and the increased



GRAPHIC 1. Inflammatory scores for the different experimental groups during the experimental period. Polyvinyl alcohol hydrogel (PVA), mesenchymal stem cells (MSCs), and expanded polytetrafluorethylene (ePTFE), [bracket] statistical significant difference between experimental groups. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

neovascularization, always surrounding the implant area, were compatible with a chronic inflammation [Fig. 3(B)]. Fibrosis is also a component of chronic inflammation due to the growth factors secreted by macrophages acting in fibroblast that leads to increase in fibrosis surrounding the biomaterial.

Macrophages must be considered in the development of immune responses to synthetic biomaterials by presenting antigen to immune competent cells such as lymphocytes and plasma cells. The macrophage is probably the most important cell in chronic inflammation because of the great number of biologically active products expressed by these cells. Among these, growth factors are responsible for the growth of fibroblasts (expressed histologically as fibrosis) and blood vessels observed in all groups at week 4 postimplantation. Also these findings can be related to the formation of granulation tissue, the hallmark of healing inflammation, consisting in the proliferation of fibroblasts, macrophages, and vascular endothelial cells and a decrease in inflammatory cells such as PMN and lymphocytes [Fig. 3(E)]. The statistical significant differences ($p < 0.05$) observed between the three PVA groups from week 1 to week 8 for the macrophage presence, being the group 3 (PVA-DX) the experimental group that presented the lowest values on two of that time points (at week 2 and week 4; Table I). This finding probably is related to the cell limiting adhesion properties and consequently with limiting activation of macrophage by DX.³⁴ The FBR, consisting mainly of macrophages and/or foreign body giant cells infiltration at the tissue-implant interface associated to the different degrees fibrosis (i.e., fibrous encapsulation), was observed at latter periods (16 and 32 weeks) of the experimental process [Fig. 3(F,G)]. With biocompatible materials, the composition of the FBR in the implantation site may be controlled by its surface properties, by the shape of the implant

and by the relationship between the surface area and the volume of the implant.^{35,36} High surface-to-volume implants such as the PVA membranes would have higher counts of macrophages and foreign body giant cells in the tissue-implant surface. The great majority of biomaterials typically elicit a FBR, a special form of nonspecific chronic inflammation. Fibrosis is considered the end-stage of FBR and consists in walling off the implant by a vascular and collagenous fibrous capsule that is typically 50–200 μm in thickness.^{37,38} The low level of fibrosis observed by the use of PVA implants is indirectly related to a lesser degree of macrophage activation induced by PVA. Growth factors and cytokines (including platelet-derived growth factor (PDGF) and tumor growth factor (TGF- β)) known to be released by activated macrophages at the onset of the foreign body response are potent mitogenics.³⁹ In addition to their role as potent mitogenics and chemotactic agents for myofibroblast progenitors,⁴⁰ PDGF-BB is associated with the early stages of myofibroblast differentiation from progenitor cells.⁴¹ TGF- β is the principal mediator of myofibroblast differentiation in wound healing, inducing fibroblasts (and

TABLE III. Determined Values for Hemolysis Index Obtained for PVA Isolated or Associated to Dextran

Biomaterial	Sheep	Human
	Blood—Hemolysis Index (%)	Blood—Hemolysis Index (%)
PVA	0.656	0.028
PVA + 1% dextran	0.001	0.002
PVA + 10% dextran	0.005	0.017
ePTFE	0.0014	0.016

Score: Nonhemolytic <2%, slightly hemolytic 2–5%, and hemolytic >5%.

PVA, polyvinyl alcohol hydrogel; MSCs, mesenchymal stem cells; ePTFE, expanded polytetrafluorethylene.

possibly other cell types) to differentiate into α -SM actin-expressing myofibroblasts with the capacity for contraction and extra cellular matrix synthesis.⁴² The fibrous wall confines the implant and consequently prevents it from interacting with the surrounding tissues which can be deleterious to the biomedical devices if their function is based in the permeability.

The form and topography of the surface of the biomaterial determine the composition of the FBR. Relatively flat and smooth surfaces such as that found on breast prostheses have a FBR that is composed of a layer of macrophages one to two cells in thickness. Relatively rough surfaces such as those found on the outer surfaces of expanded ePTFE or Dacron vascular prostheses induce a FBR composed of macrophages and foreign body giant cells at the surface. Fabric materials generally have a surface response composed of macrophages and foreign body giant cells, with varying degrees of granulation tissue subjacent to the surface response. A material in a phagocytosable form (i.e., powder or particulate) may provoke a different degree of inflammatory response than the same material in a nonphagocytosable form (i.e., film).⁴³ Multinucleated giant cells (formed by the fusion of monocytes and macrophages in an attempt to phagocytose the material with a size greater than the isolated cell) in the vicinity of a foreign body are generally considered evidence of a more severe FBR. However, it is not uncommon to see very large foreign-body giant cells containing large numbers of nuclei on the surface of biomaterials. In fact, the components of the FBR (giant cells and granulation tissue) may persist at the tissue-implant interface for the lifetime of the implant.^{43,44} Only a few published studies address so far the *in vivo* biocompatibility of PVA isolated or associated to other biomaterials. Mainly, *in vitro* studies have been performed for assessing the biocompatibility which has obvious limitations in extrapolating the results to more complex *in vivo* systems. Noguchi et al. tested the biocompatibility of PVA as an artificial articular cartilage in the intra-articular and intramuscular environment.⁴⁵ Tissue reactions of cartilage, bone, synovium, and muscle to PVA were histologically analyzed. In the tissues in which PVA was implanted, local inflammatory reaction was very slight, confirming the results here described of slight irritation to the surrounding tissues in the experimental groups 1, 2, 3, and sham. Seo et al. also studied PVA in combination with gelatin for biocompatibility by implantation in muscular tissue of rabbits, confirming that PVA induces less accumulation of inflammatory cells when compared with the control group consisting in polyurethanes.⁴⁶ Burczak et al. used PVA to encapsulate Langerhans islets in macrobags to make a hybrid-type artificial pancreas.⁴⁷ The cellular enzyme activity in the implant-encapsulating tissue was measured, regarding the acid and alkaline phosphatases. This study intended to evaluate the activity of the cells involved in the inflammatory response to the long-term macrocapsule implantation. In the long-term experimental time points (133 days) of the work of Burczak et al.,²⁵ it was evidenced the maximum activity of acidic phosphatase that is normally linked to a greater activity of macrophage.

By the histological analysis of the different experimental groups here reported, the number of macrophage remained stable or showed a tendency to decrease over time, especially in group 2 (PVA plus MSCs) where the PVA was associated to the cellular system (Table I). MSCs from the Wharton's jelly of the UC grown in aggregates that better mimic tissue environment have produced a secretome rich in trophic factors, such as HGF, TGF- β , G-CSF, VEGF-A, FGF-2, KGF, and IL-6 that promote wound healing reactions, as demonstrated both *in vitro* by vasculogenesis, mitogenic, and chemotactic assays and *in vivo*, using a chemotaxis assay where MSCs were shown to recruit surrounding bone marrow MSCs known to be directly involved in tissue regeneration. The difference between our results and the results published by Burczak et al.²⁵ can be explained by the use of distinct cross-linking processes that can influence the number of nucleophilic hydroxyl groups in the PVA macromolecule which reacts with the C3 component, which activates the alternative pathway of the complement system and is also responsible for the adhesion and activation of macrophage among other inflammatory cells.⁴⁸ It was also observed a large number of neo-vasculatures, capillaries and venules, as well as fibrosis granulation tissue at the material-tissue interface reinforcing the good biocompatibility of PVA and this in agreement with our observations of new blood vessels around the implants in the longest temporal points (16 and 32 weeks) for groups 1, 2, and 3, evidencing the good biocompatibility of the biomaterial. Cytotoxicity or cytocompatibility of PVA also was evaluated by this study using L-929 fibroblasts cell culture, the percentages of cell growth inhibition of samples were actually higher in the control group suggesting that the PVA has a superior cytocompatibility to polyurethane and low density polyethylene.⁴⁶ Even associated to calcium biphosphate (BCP) and used as scaffold for bone regeneration, PVA has proven to have no negative effects on cells growth and proliferation, and bone marrow derived stem cells possessed a favorable spreading morphology on the BCP/PVA scaffold surface.⁴⁹

The FBR presented at tissue-PVA interface was very mild, particularly in group 3 (PVA with DX). The copolymerization of PVA with biological polymers such as polysaccharides has been reported in the literature due to the increasing effect on biocompatibility of this association.⁵⁰ DX has been tested for biocompatibility (by subcutaneous implantation) in different percentage of incorporations. In higher values (75 and 100%) of added DX, the number of macrophage and lymphocyte were absent or reduced with increased when compared with the control group. Suggesting that DX reduces FBR by limiting cell adhesion, spreading, and consequently activation.^{51,52} This observations support our results (Table I), that showed a statistical significant difference ($p < 0.05$) for macrophage counting between PVA and PVA-DX groups during the entire experimental period with exception of the week 16. Mild fibrosis and the absence of giant cells during the several time points are indicative of the inexistence of FBR linked to the absence of biomaterial at surgical site. The observation of

possibly other cell types) to differentiate into α -SM actin-expressing myofibroblasts with the capacity for contraction and extra cellular matrix synthesis.⁴² The fibrous wall confines the implant and consequently prevents it from interacting with the surrounding tissues which can be deleterious to the biomedical devices if their function is based in the permeability.

The form and topography of the surface of the biomaterial determine the composition of the FBR. Relatively flat and smooth surfaces such as that found on breast prostheses have a FBR that is composed of a layer of macrophages one to two cells in thickness. Relatively rough surfaces such as those found on the outer surfaces of expanded ePTFE or Dacron vascular prostheses induce a FBR composed of macrophages and foreign body giant cells at the surface. Fabric materials generally have a surface response composed of macrophages and foreign body giant cells, with varying degrees of granulation tissue subjacent to the surface response. A material in a phagocytosable form (i.e., powder or particulate) may provoke a different degree of inflammatory response than the same material in a nonphagocytosable form (i.e., film).⁴³ Multinucleated giant cells (formed by the fusion of monocytes and macrophages in an attempt to phagocytose the material with a size greater than the isolated cell) in the vicinity of a foreign body are generally considered evidence of a more severe FBR. However, it is not uncommon to see very large foreign-body giant cells containing large numbers of nuclei on the surface of biomaterials. In fact, the components of the FBR (giant cells and granulation tissue) may persist at the tissue-implant interface for the lifetime of the implant.^{43,44} Only a few published studies address so far the *in vivo* biocompatibility of PVA isolated or associated to other biomaterials. Mainly, *in vitro* studies have been performed for assessing the biocompatibility which has obvious limitations in extrapolating the results to more complex *in vivo* systems. Noguchi et al. tested the biocompatibility of PVA as an artificial articular cartilage in the intra-articular and intramuscular environment.⁴⁵ Tissue reactions of cartilage, bone, synovium, and muscle to PVA were histologically analyzed. In the tissues in which PVA was implanted, local inflammatory reaction was very slight, confirming the results here described of slight irritation to the surrounding tissues in the experimental groups 1, 2, 3, and sham. Seo et al. also studied PVA in combination with gelatin for biocompatibility by implantation in muscular tissue of rabbits, confirming that PVA induces less accumulation of inflammatory cells when compared with the control group consisting in polyurethanes.⁴⁶ Burczak et al. used PVA to encapsulate Langerhans islets in macrobags to make a hybrid-type artificial pancreas.⁴⁷ The cellular enzyme activity in the implant-encapsulating tissue was measured, regarding the acid and alkaline phosphatases. This study intended to evaluate the activity of the cells involved in the inflammatory response to the long-term macrocapsule implantation. In the long-term experimental time points (133 days) of the work of Burczak et al.,²⁵ it was evidenced the maximum activity of acidic phosphatase that is normally linked to a greater activity of macrophage.

By the histological analysis of the different experimental groups here reported, the number of macrophage remained stable or showed a tendency to decrease over time, especially in group 2 (PVA plus MSCs) where the PVA was associated to the cellular system (Table I). MSCs from the Wharton's jelly of the UC grown in aggregates that better mimic tissue environment have produced a secretome rich in trophic factors, such as HGF, TGF- β , G-CSF, VEGF-A, FGF-2, KGF, and IL-6 that promote wound healing reactions, as demonstrated both *in vitro* by vasculogenesis, mitogenic, and chemotactic assays and *in vivo*, using a chemotaxis assay where MSCs were shown to recruit surrounding bone marrow MSCs known to be directly involved in tissue regeneration. The difference between our results and the results published by Burczak et al.²⁵ can be explained by the use of distinct cross-linking processes that can influence the number of nucleophilic hydroxyl groups in the PVA macromolecule which reacts with the C3 component, which activates the alternative pathway of the complement system and is also responsible for the adhesion and activation of macrophage among other inflammatory cells.⁴⁸ It was also observed a large number of neo-vasculatures, capillaries and venules, as well as fibrosis granulation tissue at the material-tissue interface reinforcing the good biocompatibility of PVA and this in agreement with our observations of new blood vessels around the implants in the longest temporal points (16 and 32 weeks) for groups 1, 2, and 3, evidencing the good biocompatibility of the biomaterial. Cytotoxicity or cytocompatibility of PVA also was evaluated by this study using L-929 fibroblasts cell culture, the percentages of cell growth inhibition of samples were actually higher in the control group suggesting that the PVA has a superior cytocompatibility to polyurethane and low density polyethylene.⁴⁶ Even associated to calcium biphosphate (BCP) and used as scaffold for bone regeneration, PVA has proven to have no negative effects on cells growth and proliferation, and bone marrow derived stem cells possessed a favorable spreading morphology on the BCP/PVA scaffold surface.⁴⁹

The FBR presented at tissue-PVA interface was very mild, particularly in group 3 (PVA with DX). The copolymerization of PVA with biological polymers such as polysaccharides has been reported in the literature due to the increasing effect on biocompatibility of this association.⁵⁰ DX has been tested for biocompatibility (by subcutaneous implantation) in different percentage of incorporations. In higher values (75 and 100%) of added DX, the number of macrophage and lymphocyte were absent or reduced with increased when compared with the control group. Suggesting that DX reduces FBR by limiting cell adhesion, spreading, and consequently activation.^{51,52} This observations support our results (Table I), that showed a statistical significant difference ($p < 0.05$) for macrophage counting between PVA and PVA-DX groups during the entire experimental period with exception of the week 16. Mild fibrosis and the absence of giant cells during the several time points are indicative of the inexistence of FBR linked to the absence of biomaterial at surgical site. The observation of

and PVA covered by human MSCs isolated from the Wharton's jelly of the UC are just slight irritant material to the surrounding tissues according to the ISO standard 10993-6 (annex E). Consequently, a biocompatible material that can be used in the near future is considered as a vascular graft also confirmed by an excellent blood-material interaction evaluated by hemocompatibility studies followed the Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials from the American Society for Testing and Materials (ASTM F756-00, 2000), including the hemolysis assay classic hemolysis determination. The results obtained by the *in vitro* blood-material interactions envisaged a nonhemolytic index biomaterial that needs further *in vivo* testing to confirm that promising results.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank ZEA—Sociedade Unipessoal, Lda, for the help in handling the animals during the experimental periods.

REFERENCES

- World Health Organization. Cardiovascular Disease: Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Geneva, Switzerland: Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control; 2012.
- Cleary MA, Geiger E, Grady C, Best C, Naito Y, Breuer C. Vascular tissue engineering: The next generation. *Trends Mol Med* 2012; 18:394–404.
- Lyman DJ, Murray-Wijelath J, Ambrad-Chalela E, Wijelath ES. Vascular graft healing. II. FTIR analysis of polyester graft samples from implanted bi-grafts. *J Biomed Mater Res* 2001;58:221–237.
- Tang L, Hu W. Molecular determinants of biocompatibility. *Expert Rev Med Dev* 2005;2:493–500.
- Hu WJ, Eaton JW, Ugarova TP, Tang L. Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. *Blood* 2001;98:1231–1238.
- Tang L, Eaton JW. Fibrin(ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials. *J Exp Med* 1993;178:2147–2156.
- Tang L, Ugarova TP, Plow EF, Eaton JW. Molecular determinants of acute inflammatory responses to biomaterials. *J Clin Invest* 1996;97:1329–1334.
- Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: Roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* 2004;25:5681–5703.
- Hassan C, Peppas N. Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods biopolymers. In: Abe A, Albertsson AC, editors. *PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites*. Berlin: Springer; 2000. p 37–65.
- Kokabi M, Sirousazar M, Hassan ZM. PVA-clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *Eur Polym J* 2007;43:773–781.
- Hyon SH, Cha WI, Ikada Y, Kita M, Ogura Y, Honda Y. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *J Biomater Sci Polym Ed* 1994;5:397–406.
- Wang M, Li Y, Wu J, Xu F, Zuo Y, Jansen JA. *In vitro* and *in vivo* study to the biocompatibility and biodegradation of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol)/gelatin composite. *J Biomed Mater Res Part A* 2008;85A:418–426.
- Kobayashi M, Chang YS, Oka M. A two year *in vivo* study of poly(vinyl alcohol)-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials* 2005;26:3243–3248.
- Maruoka S, Matsuura T, Kawasaki K, Okamoto M, Yoshiaki H, Kodama M, Sugiyama M, Annaka M. Biocompatibility of poly(vinyl alcohol) gel as a vitreous substitute. *Curr Eye Res* 2006;31:599–606.
- Chauat M, Le Visage C, Baille WE, Escoubet B, Chaubet F, Mateescu MA, Letourneur D. A novel cross-linked poly(vinyl alcohol) (PVA) for vascular grafts. *Adv Funct Mater* 2008;18:2855–2861.
- Joshi A, Fussell G, Thomas J, Hsuan A, Lowman A, Karduna A, Vresilovic E, Marcolongo M. Functional compressive mechanics of a PVA/PVP nucleus pulposus replacement. *Biomaterials* 2006; 27:176–184.
- Bichara DA, Zhao X, Hwang NS, Bodugoz-Senturk H, Yaremchuk MJ, Randolph MA, Muratoglu OK. Porous poly(vinyl alcohol)-alginate gel hybrid construct for neocartilage formation using human nasoseptal cells. *J Surg Res* 2010;163:331–336.
- Bichara DA, Zao X, Bodugoz-Senturk H, Ballyns FP, Oral E, Randolph MA, Bonassar LJ, Gill TJ, Muratoglu OK. Porous poly(vinyl alcohol)-hydrogel matrix-engineered biosynthetic cartilage. *Tissue Eng Part A* 2011;17:301–309.
- van Blitterswijk CA, Moroni L, Rouwkema J, Siddappa R, Sohier J. Tissue engineering—An introduction. In: van Clemens B, Peter T, Anders L, Jeffrey H, David FW, Ranieri C, Joost DdB, Jérôme S, editors. *Tissue Engineering*. Burlington: Academic Press; 2008. p xii–xxxvi.
- Marcus AJ, Woodbury D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard. *J Cell Mol Med* 2008;12:730–742.
- Fu YS, Cheng YC, Lin MYA, Cheng H, Chu PM, Chou SC, Shih YH, Ko MH, Sung MS. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons *in vitro*: Potential therapeutic application for parkinsonism. *Stem Cells* 2006;24:115–124.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004;22:1330–1337.
- Mauricio AC, Gärtner A, Armada-da-Silva P, Amado S, Pereira T, Veloso AP, Varejão A, Luís AL, Geuna S. Cellular systems and biomaterials for nerve regeneration in neurotmesis injuries. In: Pignatello R, editor. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. Rijeka, Croatia, 2011. p 415–440.
- Wang LC, Chen XG, Zhong DY, Xu QC. Study on poly(vinyl alcohol)/carboxymethyl-chitosan blend film as local drug delivery system. *J Mater Sci: Mater Med* 2007;18:1125–1133.
- Burczak K, Gamian E, Kochman A. Long-term *in vivo* performance and biocompatibility of poly(vinyl alcohol) hydrogel macrocapsules for hybrid-type artificial pancreas. *Biomaterials* 1996;17: 2351–2356.
- Zeerleder S, Mauron T, Lämmlle B, Willemin WA. Effect of low-molecular weight dextran sulfate on coagulation and platelet function tests. *Thromb Res* 2002;105:441–446.
- Abir F, Barkhordarian S, Sumpio BE. Efficacy of dextran solutions in vascular surgery. *Vasc Endovascular Surg* 2004;38:483–491.
- Neu B, Wenby R, Meiselman HJ. Effects of dextran molecular weight on red blood cell aggregation. *Biophys J* 2008;95:3059–3065.
- Fasil H, Stana J, Stropnik D, Strnad S, Stana-Kleinschek K, Ribitsch V. Improvement of the hemocompatibility of PET surfaces using different sulphated polysaccharides as coating materials. *Biomacromolecules* 2010;11:377–381.
- Gärtner A, Pereira T, Alves MG, Armada-da-Silva PAS, Amorim I, Gomes R, Ribeiro J, França ML, Lopes C, Carvalho RA, Socorro S, Oliveira PF, Porto B, Sousa R, Bombaci A, Ronchi G, Fregnan F, Varejão ASP, Luís AL, Geuna S, Mauricio AC. Use of poly(D,L-lactide-caprolactone) membranes and mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the umbilical cord for promoting nerve regeneration in axonotmesis: *In vitro* and *in vivo* analysis. *Differentiation* 2012;84:355–365.
- Amado S, Simões MJ, Armada da SP, Luís AL, Shirosaki Y, Lopes MA, Santos JD, Fregnan F, Gambarotta G, Raimondo S, Fornaro M, Veloso AP, Varejão ASP, Mauricio AC, Geuna S. Use of hybrid chitosan membranes and N1E-115 cells for promoting nerve regeneration in an axonotmesis rat model. *Biomaterials* 2008;29: 4409–4419.
- Ko FN, Hsiao G, Kuo YH. Protection of oxidative hemolysis by demethylidiosogenol in normal and thalassemic red blood cells. *Free Radical Biol Med* 1997;22:215–222.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–317.

34. Massia SP, Stark J, Letbetter DS. Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials* 2000;21:2253-2261.
35. Rae T. The macrophage response to implant materials with special reference to those used in orthopedics. *Crit Rev Biocompat* 1986;2:97-126.
36. Greisler H. Macrophage-biomaterial interactions with bioresorbable vascular prostheses. *ASAIO Trans* 1988;34:1051-1059.
37. Williams GT, Williams WJ. Granulomatous inflammation—A review. *J Clin Pathol* 1983;36:723-733.
38. Kovacs EJ. Fibrogenic cytokines: The role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today* 1991;12:17-23.
39. Luttkhuizen DT, Harmsen MC, Van Luyn MAJ. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng* 2006;12:1955-1970.
40. Lindahl P, Christer. Not all myofibroblasts are alike: Revisiting the role of PDGF-A and PDGF-B using PDGF-targeted mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7:21-26.
41. Oh SJ, Kurz H, Christ B, Wilting J. Platelet-derived growth factor-B induces transformation of fibrocytes into spindle-shaped myofibroblasts in vivo. *Histochemistry* 1998;109:349-357.
42. Leask A, Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004;18:816-827.
43. Ratner BD, Schoen FJ. Chapter II. 3.2—The concept and assessment of biocompatibility. In: Buddy DR, Hoffman AS, Frederick JSaJ, Lemons JE, editors. *Biomaterials Science*, 3rd ed. Oxford, UK: Academic Press; 2013. p 588-592.
44. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008;20:86-100.
45. Noguchi T, Yamamuro T, Oka M, Kumar P, Kotoura Y, Hyon SH, Ikada Y. Poly(vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage: Evaluation of biocompatibility. *J App Biomater* 1991;2:101-107.
46. Seo KH, You SJ, Chun HJ, Who CHK, Lim Y. In vitro and in vivo biocompatibility of x-ray crosslinked gelatin-poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Tissue Eng Regen Med* 2009;6:414-418.
47. Burczak K, Gamian E, Kochman A. Long-term in vivo performance and biocompatibility of poly(vinyl alcohol) hydrogel macrocapsules for hybrid-type artificial pancreas. *Biomaterials* 1996;17:2351-2356.
48. Sawada K, Shimoyama T, Malchesky PS, Goldcamp JB, Omokawa S. Evaluation of a relationship between polymer bulk hydroxyl and surface oxygen content and in vitro serum-material interaction. *J Biomed Mater Res* 1993;27:547-555.
49. Nie L, Chen D, Suo J, Zou P, Feng S, Yang Q, Yang S, Ye S. Physicochemical characterization and biocompatibility in vitro of biphasic calcium phosphate/poly(vinyl alcohol) scaffolds prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering applications. *Colloids Surf B* 2012;100:169-176.
50. Alhosseini SN, Mozarzadeh F, Mozafari M, Asgari S, Dodel M, Samadikuchaksaraei A, Kargozar S, Jalali N. Synthesis and characterization of electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *Int J Nanomed* 2012;7:25-34.
51. Cadée JA, van Luyn MJA, Brouwer LA, Plantinga JA, van Wachem PB, de Groot CJ, den Otter W, Hennink WE. In vivo biocompatibility of dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res* 2000;50:397-404.
52. Abed A, Assoul N, Ba M, Derkaoui SM, Portes P, Louedec L, Flaud P, Bataille I, Letourneur D, Meddahi-Pellé A. Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res Part A* 2011;96A:535-542.
53. Li H, Chen C, Zhang S, Jiang J, Tao H, Xu J, Sun J, Zhong W, Chen S. The use of layer by layer self-assembled coatings of hyaluronic acid and cationized gelatin to improve the biocompatibility of poly(ethylene terephthalate) artificial ligaments for reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Acta Biomater* 2012;8:4007-4019.
54. Alauzun JG, Young S, D'Souza R, Liu L, Brook MA, Sheardown HD. Biocompatible, hyaluronic acid modified silicone elastomers. *Biomaterials* 2010;31:3471-3478.
55. Elakkiya T, Sheeja R, Ramadhar K, Natarajan TS. Biocompatibility studies of electrospun nanofibrous membrane of PLLA-PVA blend. *J Appl Polym Sci* 2013;128:2840-2846.
56. Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: Current concepts and future trends. In: Keating A, Dicke K, Gorin N, Weber R, Graf H, editors. *Regenerative and Cell Therapy*. Berlin: Springer; 2005. p 35-67.
57. Martino S, D'Angelo F, Armentano I, Kenny JM, Orlacchio A. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Bio-technol Adv* 2012;30:338-351.
58. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkada B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* 2010;19:667-679.
59. Cascone MG, Maltinti S, Barbani N, Laus M. Effect of chitosan and dextran on the properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. *J Mater Sci: Mater Med* 1999;10:431-435.
60. Ueberrueck T, Tautenhahn J, Meyer L, Kaufmann O, Lippert H, Gastinger I, Wahlers T. Comparison of the ovine and porcine animal models for biocompatibility testing of vascular prostheses. *J Surg Res* 2005;124:305-311.
61. Eisenberg S. The effect of low molecular weight dextran on the viscosity and suspension characteristics of blood. *Am J Med Sci* 1969;257:336-343.
62. Fernandes JC, Eaton P, Nascimento H, Lü B, Rocha S, Vitorino R, Amado F, Gomes J, Santos-Silva A, Pintado ME, Malcata FX. Effects of chitooligosaccharides on human red blood cell morphology and membrane protein structure. *Biomacromolecules* 2008;9:3346-3352.
63. Fernandes HP, Cesar CL, Barjas-Castro MdL. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011;33:297-301.
64. Chiellini E, Corti A, D'Antone S, Solaro R. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials. *Prog Polym Sci* 2003;28:963-1014.
65. Schoen FJ. Chapter II. 2.7—Tumors associated with biomaterials and implants. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. *Biomaterials Science*, 3rd ed. Oxford, UK: Academic Press; 2013. p 558-565.

1.4. Artigo 3

Journal of Biomedical Materials Research Part A (2014) (Accepted)

**IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF BLOOD COAGULATION ACTIVATION OF
POLYVINYL ALCOHOL HYDROGEL PLUS DEXTRAN BASED VASCULAR GRAFTS.**

Journal of Biomedical Materials Research: Part A



Journal of Biomedical
Materials Research
Part A

**In vitro and in vivo evaluation of blood coagulation
homeostasis of polyvinyl alcohol hydrogel plus dextran
based vascular grafts.**

Journal:	<i>Journal of Biomedical Materials Research: Part A</i>
Manuscript ID:	JBMR-A-14-0119
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	30-Jan-2014
Complete List of Authors:	Alexandre, Nuno; Universidade de Évora, Zootecnia; Universidade de Évora, Instituto de Ciências Agro-ambientais Mediterrâneas Costa, Elisio; Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas; Universidade do Porto, Instituto de Biologia Molecular e Celular Coimbra, Susana; Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário, Centro de Tecnologias de Diagnóstico e Terapêutica; Universidade do Porto, Instituto de Biologia Molecular e Celular Santos-Silva, Alice; Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas; Universidade do Porto, Instituto de Biologia Molecular e Celular Lopes, Maria; Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, CEMUC, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais Rodrigues, Miguel; Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, CEMUC, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais Santos, Marta; Bioskin, Molecular and Cell Therapies Mauricio, Ana Colette; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Departamento de Clínicas Veterinárias; Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares, Centro de Estudos de Ciência Animal Santos, J D; Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, CEMUC, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais Luis, Ana; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Departamento de Clínicas Veterinárias; Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares, Centro de Estudos de Ciência Animal
Keywords:	Polyvinyl alcohol hydrogel, Dextran, Coagulation , Homeostasis, Vascular graft

SCHOLARONE™
Manuscripts

John Wiley & Sons, Inc.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Title: *In vitro* and *in vivo* evaluation of blood coagulation homeostasis of polyvinyl alcohol hydrogel plus dextran based vascular grafts.

Nuno Alexandre^{1,2*}, Elísio Costa^{6,7}, Susana Coimbra^{7,8}, Alice Silva^{6,7}, Ascensão Lopes⁵, Miguel Rodrigues⁵, Marta Santos⁹, Ana Colette Maurício^{3,4}, José Domingos Santos⁵, Ana Lúcia Luís^{3,4}

¹ Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Apartado 94, 7002-554, Évora, Portugal

² Instituto de Ciências Agro-ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Pólo da Mitra, Apartado 94, 7002-554, Évora, Portugal

³ Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares (ICETA), Rua D. Manuel II, Apartado 55142, 4051-401, Porto, Portugal.

⁴ Departamento de Clínicas Veterinárias, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto (UP), Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228, 4050-313 Porto, Portugal.

⁵ CEMUC, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, 4200-465 Porto, Portugal.

⁶ Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto (UP), Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228, 4050-313 Porto, Portugal.

⁷ Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto (UP), Rua do Campo Alegre, nº823, 4150 Porto, Portugal.

⁸ Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário (CESPU). Central de

Gandra, 1317, 4585-116 Gandra, Portugal.

⁹ Biosckin, Molecular and Cell Therapies, SA, Tecmaia, R. Engenheiro Frederico Ulrich,
nº2650, 4470-605 Maia, Portugal.

* Corresponding author:

Nuno Alexandre

Universidade de Évora, Departamento de Zootecnia, Pólo da Mitra, Apartado 94,

7002-554, Évora, Portugal

Email: nmla@uevora.pt

Fax: +351 266 760 841

phone: +351 266 760 82

Abstract

Polyvinyl alcohol hydrogel (PVA) is a water-soluble synthetic polymer with an increasingly use in biomedical applications including vascular grafting. It was argued that the copolymerization of PVA with dextran (Dx) can result in an improvement of blood/biomaterial interactions. The focus of this experimental work is to assess that interaction through an *in vivo* and *in vitro* evaluation of the coagulation system activation. The thrombogenicity of the copolymer was determined by quantification of the adhered platelets, by the lactate dehydrogenase assay (LDH), quantification of whole blood clotting time and by quantification of platelet activation assessed by flow cytometry. The thrombin-antithrombin complex value was also determined. The obtained results for the *in vitro* assays suggested a non-thrombogenic profile for PVA/Dx. Additionally; the *in vivo* determinations were focused in the coagulation and hematological profile assessment in the animal model (sheep) after PVA/Dx vascular graft implantation. For coagulation homeostasis assessment, the intrinsic and extrinsic pathway activation was measured by the determination of prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT). Other coagulation activation and inflammatory markers like D-dimers, interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) were also assessed. The PVA/Dx (90/10, v/v) copolymer tended to inhibit the platelet adhesion/activation process and the contact activation process for coagulation. Those results were also confirmed with the *in vivo* experiments where the measurements for APTT, IL-6 and CRP parameters were normal considering the species normal range values. The response to those events is an indicator of the *in vitro* and *in vivo* hemocompatibility of PVA/Dx and it allows us to select this biomaterial for further pre-clinical trials in vascular reconstruction.

1. Introduction

The national hospital discharge survey (NHDS) estimates that in 2010, in the United States, 219000 patients underwent a total of 397 000 coronary artery bypass procedures to treat coronary heart disease¹. In the process of treating this pathology, autologous blood vessels are the first option for revascularization. Nevertheless, up to 30% of the patients who require arterial bypass surgery do not possess suitable or sufficient autologous blood vessels, necessitating the use of synthetic grafts². Polyethylene-terephthalate (PET) and expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) are currently used for prosthetic vascular grafts (ePTFE) providing satisfactory results when used to replace or by-pass large diameter blood vessels³. However, the performances of those biomaterials in small-diameter vascular grafts are poor when compared to autologous vein grafts as concern to the patency rate⁴. When used for femur-popliteal bypass grafting, PET and ePTFE presented a patency rate of 36% and 47% functional after 2 years, respectively². Despite of an overall similar patency rate, ePTFE has a higher primary patency rate supporting the preferential use of ePTFE in patients with critical limb ischemia, especially when a below-knee distal anastomosis and a smaller diameter graft is required⁵. A long term retrospective study compared the performance of ePTFE and vein grafts for bypass procedures during five years, and concludes that the patency rate was clearly inferior for ePTFE, 39% vs 74%, respectively⁴. More recently, polyurethane (PU) has been used into vascular grafts, known for elasticity and greater compliance than either PET or ePTFE; these properties have been suggested to result in less intimal hyperplasia at anastomotic site and potentially a better patency rate than former mentioned biomaterials. However, it was not demonstrated by the more recently clinical reports that PU grafts had a superior patency rate as compared to ePTFE⁶. The functional performance of artificial grafts is critical bonded to the blood compatibility of their biomaterials.

To address this problem, small-diameter vascular grafts have become a major area of research and more specifically blood compatibility a discipline of interest for the success of artificial

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

vascular grafts. The activation of coagulation cascade is a key aspect for devices that contact with blood, determines the hemocompatibility of the biomaterial, and the degree of activation that can lead to a formation of a blood clot (thrombus) as a major complication^{7,8}. Due to the functional and blood-interaction poor performance of currently used biomaterials, a large variety of polymers, have been evaluated for the development of synthetic vascular grafts without outstanding success. Several strategies were adopted to increase the hemocompatibility of biomedical materials including surface modification, such as inorganic coatings (carbon based) on artificial vascular grafts⁹, bioactive coatings with fragments of biomacromolecules, such as in the immobilization of heparin¹⁰. Passivation of surfaces through endothelialization of graft inner surface using endothelial cell auto-transplantation has become a successful procedure to improve the long term patency rate¹¹. Other strategies include a covalently linked coating layer, by employing brushes of long-chained hydrophilic molecules like poly-ethylene oxide¹², and chemical composition modifications of polymer surfaces¹³. More recently, the effect of topography surface changing was been addressed in hemocompatibility strategy improvement¹⁴.

Polyvinyl alcohol (PVA) is a water-soluble synthetic polymer with an increasingly use in biomedical applications and potentially as a vascular graft¹⁵. This polymer is produced by polymerization of vinyl acetate to poly (vinyl) acetate, followed by hydrolysis of polyvinyl acetate to polyvinyl alcohol. PVA must be cross-linked in order to be useful for a wide variety of applications, especially in the areas of medicine and pharmaceuticals sciences. Initially used in food chemistry and waste water applications, its use has been extended to biomedical applications including contact lenses, wound dressings, local drug delivery systems and catheters¹⁶⁻¹⁸. More recently, other biomedical applications were tested under experimental conditions like vascular grafts, artificial meniscus, intervertebral disc prosthesis, and also as a vitreous substitute¹⁹⁻²². In the present work, with the aim of improving hemocompatibility, PVA membranes were synthesized by copolymerization with dextran. Dextran is a polysaccharide,

which is a biopolymer molecule with multiple effects in blood coagulation homeostasis including platelet activation inhibition²³, diminished fibrin polymerization^[24], decreased blood viscosity and erythrocyte rouleaux formation²⁵, which can improve hemocompatibility if associated to other biomaterials like PVA.

Depending on the type of additives they contain, PVA hydrogels can be considered biocompatible in nature and are non-irritating to soft tissues when in contact with them, making them suitable for many biomedical applications. However, there is a lack of information about the influence of PVA plus dextran in the coagulation cascade in both experimental scenarios (*in vitro* and *in vivo*). In this study, it is our objective to investigate the interaction of PVA plus dextran (90/10, v/v) *in vitro* with blood and *in vivo* by using an animal model (sheep) in order to assay its application as a vascular graft.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of samples

For the production of PVA membranes modified with dextran (Sigma Aldrich®, molecular weight: 64000-76000 daltons, St. Louis, USA), two solutions were mixed, one solution of PVA at 20% (w/v) with a solution of dextran (Dx) at 1% (w/v). The final mixture was made using the proportion of dextran to PVA at 10/90 (v/v). The dextran solution was added to the PVA solution when the PVA powder was completely dissolved. After the final solution was completed, it was immersed in an ultrasound bath for 30 minutes for removing air bubbles. Physical reticulation was achieved by three cycles of freezing/thawing, followed by the annealing process for the production of PVA/Dx membranes. The freezing was done in a refrigerator at -28°C during 6 hours, while the thawing process was done in an incubator at 25°C for two hours. For the annealing process, membranes were left in the incubator for 14 hours at 25°C, progressively the temperature was raised every two hours by 10°C until reaching a final temperature of 80°C. At this temperature, PVA/Dx membranes remained at

the incubator for 20 hours. After the initial gels were obtained, 3 cm pieces of the gel were cut and further reinforced physically by immersing in a NaOH solution (1.0 N) for 2 ½ hours at 37°C followed by the hydration and rinsing in distilled water. PVA/Dx membranes were made circular with a diameter of 10 mm and 78.5 mm² of area. Polypropylene films with equivalent area and thickness were prepared as a negative control. Also glass films or beads were used as positive controls for this assays.

2.2 *In vitro* studies

2.2.1 Preparation of platelet-rich plasma (PRP), platelet-poor plasma (PPP) and blood samples

Blood was drawn from three human adult healthy volunteers and from three adult healthy sheep females by venipuncture into sodium citrate tubes (S-monovette® 5 ml 9 NC, Sarstedt AG & co, Nümbrecht, Germany). The first 3 ml of blood drawn was discarded to avoid contamination by thromboplastin caused by needle puncture. For PRP, whole blood was centrifuged at 250g for 15 minutes and the platelet-rich supernatant was removed. Platelet concentration on PRP was determined using an automated cell blood counter (ABX Micros ES 60, Horiba, Ltd) prior to incubation with samples. In order to obtain PPP, citrate tubes were spun at 2000g for 15 minutes and the supernatant was collected to a simple tube until further processing.

2.2.2 Scanning electron microscopy (SEM)

Samples were incubated with 500 µl of PRP for two hours at 37°C in duplicate for PVA/Dx, glass and polypropylene. After incubation the samples were washed extensively with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) to remove the non-adherent cells from the surface. Adhesion of blood cells and changes in morphology, as well as, the formation of fibrin on the sample surfaces were investigated. The adherent cells and the biomaterials were fixed for at least two hours with glutaraldehyde and paraformaldehyde. Afterwards samples were dehydrated with

a graded ethanol series. Subsequently the samples were critical point dried. Samples were coated with an Au/Pd thin film, by sputtering, using the SPI Module Sputter Coater equipment. The SEM exam was performed using a High resolution (Schottky) Environmental Scanning Electron Microscope with X-Ray Microanalysis and Electron Backscattered Diffraction analysis: Quanta 400 FEG ESEM / EDAX Genesis X4M in high vacuum mode. Each image contains a databar with the most important analysis conditions.

2.2.3 Quantification of platelet adhesion

Platelet adhesion was quantified by the previously described method [26]. PVA/DX, polypropylene and glass samples were incubated in triplicate for PVA, glass and polypropylene with PRP for one hour at 37°C under static conditions in 16 well plate. The solution of PRP that was put in contact with the different membranes contained platelets with the following concentrations: human PRP $211 \times 10^3/\text{mm}^3$ and sheep PRP $155 \times 10^3/\text{mm}^3$. The suspension was aspirated and each well was rinsed carefully three times with PBS. The number of adherent platelets was determined by detecting the amount of lactate dehydrogenase (LDH) present after cell lysis. The adherent cells were lysed by incubation with 2% triton-PBS buffer for one hour at 37°C. A colorimetric substrate (Promega, cytotoxicity assay, Madison, USA) was added and incubated for 30 min at 37°C in a dark room. The reaction was stopped with the addition of a stop solution (Promega.com, Cytotoxicity assay, Madison, USA). The optical density was measured by a spectrophotometer (Biotek Powerwave XS) at 490 nm with a reference wavelength of 650 nm. A calibration curve was generated from a series of serial dilutions of a known platelet concentration and used to determine the number of adherent platelets.

2.2.4 Quantification of platelet activation by flow cytometry

Platelet activation was performed using a BD Accuri C6 (BD Biosciences, California, USA) on single stained platelet sample. PVA/DX, polypropylene and glass beads samples were incubated in triplicate with PRP for two hours at 37°C under agitation. After incubation, platelets (100 μL of suspension) were diluted 5-fold using physiologic saline, in order to

minimize the presence of aggregates in sample. Platelets were stained with anti-CD42a/GP9 PE (Thermo Scientific, Illinois, USA) and anti-CD62P APC (Biolegend, San Diego, USA). Samples and antibodies were incubated in the dark at room temperature for 15 minutes. Platelets were identified by forward and side scatter signals, and 15000 platelet-specific events were analyzed by the flow cytometer for florescence. CD42a/GP9 expression was used to identify the platelets and the CD62P expression was used to evaluate the platelet activation.

2.2.5 Quantification of whole blood clotting time

The thrombogenicity of PVA plus dextran was evaluated using a whole blood kinetic clotting time method as previously described²⁷. Four samples, each 10 mm in diameter, were used per time point. The clotting reaction was activated with the addition of 850 μ l CaCl_2 (0.1 M) to the 8.5 ml of sodium citrate blood. A 100 μ l volume of activated blood was added to glass beads (Sigma Aldrich, 18406-500G, St. Louis, USA), PVA/Dx and polypropylene samples, which were placed in the wells of a 12-well plate. All samples were incubated at room temperature for 5,15,25,35 and 45 min. At the end of each time point, the samples were incubated with 3 ml of distilled water for 5 min. Each well was sampled in triplicate (200 μ l each) and transferred to a 96 well plate. The red blood cells that were not trapped in a thrombus were lysed with the addition of distilled water, thereby releasing hemoglobin into the water for subsequent measurement. The concentration of hemoglobin in solution was assessed by measuring the absorbance at 540 nm using a 96 well plate reader (Biotek Powerwave XS). The size of the clot is inversely proportional to the absorbance value.

2.2.6 Measurement of plasma recalcification profiles

Plasma recalcification times were determined by the method described by Motlagh²⁷. PVA/Dx samples were placed in a 96-well plate covering the entire bottom surface of the dish, and 100 μ l of PPP was added to each well. Controls consisted of tissue culture-treated plastic (TCP) exposed to PPP with (positive control) and without CaCl_2 (negative control). Following the addition of PPP, 100 μ l of 0.025 M CaCl_2 was added to each well (except in the negative

control). The plate was then immediately placed in a 96 well plate reader (Biotek Powerwave XS), where the kinetics of the clotting process due to the recalcification were monitored by measuring the absorbance at 405 nm (every 30s for 45 min) at 37°C. In calculating the mean absorbance at each time point, six wells were averaged per sample. The slope of the linear portion of each profile and the clotting time to reach half maximal absorbance were calculated and analyzed.

2.2.7 Measurement of thrombin-antithrombin complex (TAT) generation

The generated biomaterials were incubated in triplicate with freshly drawn human and sheep blood. Approximately 1 ml of whole blood was put in each well covering completely the tested materials. During the incubation period (37°C, 2h) the wells were agitated to avoid sedimentation of red blood cells. After incubation, the blood was aspirated and centrifuged at 2000g for 15 min in order to obtain PPP. The PPP was analyzed in respect to changes in activation markers for coagulation (TAT). The ELISA assay, used to quantify the latter substance, was obtained as follows: TAT (Thrombin-Antithrombin complex Human ELISA Kit ab108907, abcam®). The ELISA plates were analyzed using a spectrophotometer (Biotek Powerwave XS).

2.3 *In vivo* coagulation and hematological profile assays

The effects of PVA plus dextran vascular grafts in the coagulation homeostasis were evaluated *in vivo* after their application in an animal model (sheep). Fourteen sheep were anesthetized and PVA plus dextran grafts were implanted at the left common carotid artery by top-to-top anastomosis. The anesthetic protocol consisted in xylazine (0.2 mg/Kg, intravenous) as tranquilizer. For inducing anesthesia, sodium thiopental was used at a dose of 15 mg/Kg intravenous. The anesthetic maintenance was done with isoflurane at 2% via endotracheal intubation carried by 100% oxygen with a flow of 2L/min. All animals were heparinized intra-operatively by intravenous administration of 100 IU/Kg. The animals are divided in two

experimental groups, one group received grafts with 5 cm length and the other group the 7 cm long graft. Both types of grafts had 1 mm thickness. Blood was drawn by venipuncture of right external left jugular vein into sodium citrate and EDTA tubes (S-monovette® 5 ml NC and EDTA, Sarstedt AG & co, Nümbrecht, Germany), at several experimental time points (0,4 and 8 days, 4,8,12 and 16 weeks). The first 3ml of blood collection were discarded to avoid contamination by tissue thromboplastin caused by needle puncture. A cell blood count (CBC) with a blood smear were done in order to observe erythrocyte morphology and to validate the platelet count. Additional, for the microhematocrit technique a capillary tube was filled with EDTA anticoagulated whole blood by capillary action. The unfilled end is sealed and the tube was centrifuged for 5 minutes at 10000 rpm. After centrifugation, the capillary tube is placed in a reading device and the hematocrit value was determined. The CBC was made using an automated counter (ABX Micros ES 60, Horiba, Ltd). PPP was obtained as previously and several measurements of coagulation activation and inflammatory markers were performed. Among those markers, D-dimers, interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) levels were assessed using ELISA (eBioscience, Human IL-6 High Sensitivity ELISA; Uscn, Life Science Inc. E90506Hu ELISA for D-dimer; eBioscience, Human C-Reactive Protein ELISA Kit). The ELISA plates were analyzed using a spectrophotometer (Biotek Powerwave XS). The protrombin time (PT) and the activated partial thromboplastin time (APTT) were also evaluated by using clotting assay (Coagulation analyzer Coatron M4, Teco Medical Instruments GmbH, Neufahrn, Germany; APTT-XL and TEClot PT-S, Teco Medical Instruments GmbH, Neufahrn, Germany).

2.4 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS version 19.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Results are presented as mean \pm SD. The Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate normality. In cases of normal distribution, we used the paired-sample t-Student test; in cases of abnormal distribution we used the Wilcoxon test. Multiple comparisons between groups were

performed by one-way ANOVA supplemented with Turkey's HSD post hoc test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 *In vitro* studies

3.1.1 Scanning electron microscopy

The analysis of the surfaces (incubated with PRP) by SEM allowed the assessment of the morphology of platelets by the change in shape in developing pseudopodia versus their activation level. Well-defined sequence of morphological changes and an increasing level of activation can be classified as: 1 – round or discoid; 2 – dendritic or early pseudopodial, without flattening, 3-spread-dendritic or intermediate pseudopodial, 4-spread or late pseudopodial, 5- fully spread²⁸. After activation, platelets contract and release the contents of their granules into the extracellular environment. These granular contents activate other platelets, cause irreversible platelet aggregation and lead the formation of a platelet thrombus. Among other parameters, the shape of platelet adhering to surfaces is one of the characteristics of biocompatibility²⁹. The morphology of attached platelets after 2 hours incubation is displayed in Figure 1.

At PVA/Dx surfaces, it was observed a predominance of round/discoid and dendritic/early pseudopodial morphologies without platelet aggregation (Figure 1) suggesting a poor activation of platelets in both samples of PRP. The hydrophilicity of PVA/Dx surface can explain that result by the lower adsorption of fibrinogen to that type of surfaces³⁰. When fibrinogen adsorbs to a surface, occurs an unfolding that exposes receptor sites to platelet adherence and activation³⁰. Several authors referred that PVA can activate platelets but it was observed a scarce platelet adherence due to the lack of fibrinogen adsorption to investigated surfaces³¹⁻³³. Polypropylene surfaces due to hydrophobic nature, potentially can activate and stimulate platelet adherence.

The obtained images at the polypropylene interfaces, revealed a larger number of adhered platelets with an activated phenotype. By the images analysis, platelets showed a predominance of configurations between spread or late pseudopodial and fully spread (Figure 1). These data is supported by other authors that reported the same findings^{29,34}. In glass surfaces, platelets showed an adherence behaviour, although the activation of that celular elements remained at stage 2 – dendritic or early pseudopodial appearance. In spite of the hydrophobical nature of glass there are other properties that can influence platelet activation. Besides hydrophilicity/hydrophobicity balance, the roughness, the charge density of the surfaces and the micropore diameters are also characteristics that influence adherence and activation³⁵. Surprisingly platelets when in contact with glass didn't exhibited a more activated appearance as expected. Platelets tend to adhere more frequently to flat surfaces like glass¹⁴. Nevertheless, fibrinogen adhesion process is critical for platelet adhesion to surfaces³⁰ and his conformation can influence platelet activation³⁶. It is our believe that in this case, silica glass caused conformational changes to the adsorbed fibrinogen that lead to minor activation of platelets³⁷. Finnally, it can be considered that PVA/Dx neither stimulates adherence or activation of platelets.

3.1.2 Quantification of platelet adhesion and activation

The platelet morphology and aggregation at biomaterials surface are markers of platelet activation³⁸. For that reason, the assessment of biomaterial thrombogenicity involved the use of tests that measure directly or indirectly platelet adhesion and granule content release²⁶. In the present work, the number of platelets adhered to each tested surface was quantified by the activity of lactate dehydrogenase (LDH). A significantly ($P<0.05$) lower percentage of platelets adhered to PVA/Dx and polypropylene (16.73% and 31.93% in sheeps; 27.87% and 11.91% in humans) membranes respectively as compared to glass in both humans and sheeps (Table 1). Concerning to the number of adhered platelets there was a significantly ($P<0.05$) lower number at PVA/Dx and polypropylene membranes when compared to glass, in both

human and sheep PRP (Table 1). Even in the assay that used sheep PRP, PVA/Dx membranes had a significantly lower number of platelets at the surface when compared to polypropylene. In spite of the lower number and percentage of adhered platelets to PVA/Dx, some surfaces may not support platelet adhesion but on the other hand, might still activate platelets^{33,39}. PVA has been described as a biomaterial that activates platelets with low platelet adherence even with fibrinogen pre-treatment³³. Additionally, a lower percentage of activated platelets (Figure 2A) and of florescence (Figure 2B) was found in PRP incubated with PVA/Dx and polypropylene membranes when compared to glass, in human samples (Figure 2). The hidrophilicity of biomaterials is the key aspect that influences fibrinogen adherence and by consequence, the platelet adhesion^{39,40}. Due to its high water content, PVA is described as a high hydrophilic material. The obtained data suggests that PVA/Dx is less thrombogenic than polypropylene, considering sheep PRP. Nevertheless, PVA/Dx and polypropylene were considered less thrombogenic than glass using sheep or human PRP.

3.1.3 Quantification of whole blood clotting time

Whole blood was used to determine clotting times and provide information on the thrombogenicity and pro-coagulative activity of each biomaterial. In this test, whole blood is allowed to clot in contact with the biomaterial. As clotting process occurs, more erythrocytes are retained in the fibrin clot, and consequently less hemoglobin is released by erythrocyte lysis caused by the addition of distilled water. A more hemocompatible material will maintain a higher absorbance value over time. The results showed us that polypropylene and PVA/Dx were the less thrombogenic material. In the opposite side, glass microspheres presented the shorter quickest clotting time (Figure 3). The values obtained for PVA/Dx were not statistical significant different ($P>0.05$) compare to those of polypropylene. Our results were in agreement with others and published papers, that tested PVA in combination with natural polysaccharides (like cellulose)⁴¹. The surface area, apart from the intrinsic characteristics of biomaterials, is other factor that can influence the clotting time values⁴². In order to reduce

the influence of that factor, the polypropylene and PVA/Dx samples were cut with the objective of completely cover the well bottom. In the case of PVA/Dx, this hydrogel is porous and when hydrated presents a dome shaped structure. This fact might increase the surface for blood-material interaction which may negatively affect the comparative analysis of the results.

3.1.4 Measurement of plasma recalcification profiles

The plasma recalcification profile obtained by the contact with PPP is often used as measure of activation of the intrinsic pathway^{43,44}. The performance of biomaterials exhibited by this test results are exclusively an indicator of the contact phase activation. Coagulation cascade is only one part of thrombotic pathway and platelet interactions are an extremely important part of that event⁴⁵. It is observed as plasma becomes more turbid due to the accumulation of fibrin, the absorbance values increases. The measure of coagulation pathway activity is given by the time it takes to achieve half the maximum absorbance (half-max time); the higher this value, the less thrombogenic is the biomaterial. The shift of the curve is also used as a measure of the velocity of the clotting time. A rightward shift of the curve indicates a slower clotting time, in the opposite way a leftward shift indicates a faster one. In our work, the half-max time for PVA/Dx was 16.05 min \pm 0.37 which is statistically significant different ($P < 0.05$, $n = 6$) from the half-max time value from TCP (34.28 min \pm 0.43), indicating a more thrombogenic surface (Figure 4). PVA/Dx produced a leftward shift in the kinetic profile suggesting a faster clotting time. Whereas, for TCP a rightward shift was observed as concerned the kinetic profile (Figure 5).

The slope of the linear portion (Figure 6) of the curve was used as a measure of the clotting rate. Our observations showed that there wasn't statistical difference ($P > 0.05$) between PVA/Dx and TCP, indicating a similar rate of clotting for both surfaces (Figure 6). The above results analyzed together, suggest that TCP is less coagulative than PVA/Dx. However, when compared to other copolymers that included PVA, the half-max time of PVA/Dx is superior to published results⁴¹.

3.1.5 Measurement of thrombin-antithrombin complex expression

The generation of thrombin was measured indirectly by the ELISA determination of TAT. TAT is a parameter of contact activation. The obtained results for TAT were lower for PVA/Dx (6.66 ± 0.63 ng/ml) and a statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to positive controls (14.19 ± 4.67 ng/ml) and even with the negative controls (12.01 ± 3.78 ng/ml) (Table 2). In spite of the intrinsic coagulation pathway, thrombin is considered to be the main initiator of the coagulation cascade when blood specifically comes in contact with biomaterial surfaces. The mechanism by which thrombin is generated on the polymer surface of a biomaterial is not yet fully understood. However, the formation of trace amounts of thrombin through the activation of the contact system could induce an amplification loop using thrombin's activating properties on Factor XI⁴⁶. Thrombin is responsible for converting fibrinogen to fibrin, is also able to stimulate platelet activation and overall to thrombus formation. For that reasons thrombin synthesis is a key event in biocompatibility/incompatibility reactions. A lower value of thrombin synthesis is an indicator of good hemocompatibility.

3.2 *In vivo* coagulation and hematological profile assays

Several parameters of coagulation profile were assessed during the experimental period in order to evaluate the activation of intrinsic and extrinsic pathways of coagulation by the PVA/Dx vascular grafts. aPTT is a functional determination of the intrinsic pathway of coagulation (Factors XII, XI, IX, VIII, pre-kallikrein, and high molecular weight kininogen). This pathway is initiated by the interaction of Factor XII with a negatively charged surface that activates a cascade mechanism resulting in thrombin activation and fibrin production that consequently leads to a clot formation. Although, the intervention of biomaterials surface in FXII activation and their exact role in extrinsic pathway activation is controversial. During the several time points aPTT was within the normal range for sheep and even in the experimental

period there wasn't significant statistical difference between the values (Table 3 and Table 4) obtained before and after surgical implantation which is in accordance with other *in vivo* assays using other cardiovascular devices or surgical procedure⁴⁷. Suggesting that activation of Factor XII even in higher levels is not related or plays a little role in the activation of coagulation by biomaterials without any correlation with TAT formation^{47,48}. After surgery (in both experimental groups) aPTT values didn't show the expected upraising as described by several authors^{49,50}. The PT is a functional determination of the extrinsic pathway of coagulation and is extremely sensitive to the vitamin-K dependent clotting factors (Factors II, VII, and X)^{51,52}. Tissue factor (Factor III) is a transmembrane protein that is widely expressed on cells of non-vascular origin, which activates Factor VII during the initiation of the extrinsic coagulation pathway. The data obtained evidenced that PT values were constant during the healing period of 16 weeks and the values obtained before and after surgery were not significantly different (Table 3 and Table 4). Nowadays, the tissue factor (TF) is considered the main contributor of blood-material interactions to activation of coagulation by biomaterials, being monocytes the main responsible for that expression⁵³. In spite of the positive results obtained, it cannot be conclude only based on determinations of both pathways of coagulation the importance of PVA/Dx grafts on *in vivo* thrombosis process. PVA have been previously evaluated *in vitro* for hemocompatibility in co-polymerization with bacterial cellulose and methoxy polyethylene glycol with promising results for thrombogenicity, activation of complement and Factor XII at *in vitro* settings⁴¹.

D-dimer is a widely used biomarker of endogenous fibrinolysis, and elevated levels may be found in patients with several conditions in vascular pathologies, such as vascular thromboembolism or acute aortic dissection^{54,55}. In the present work, a statistical significant ($P<0.05$) increase in the levels (Table 3) of D-dimers was observed after surgery (T0 vs T4) in both experimental groups (Table 3 and Table 4). This finding can be related to a formation of thrombus or simply by the surgical procedure⁵⁶. A peak was observed at day 4, stabilizing

1
2
3 within normal limits from day 8 onwards until week 16 post-surgery. The kinetics of D-dimers
4 was in accordance with data from previous reports concerning surgical patients, where the
5 peak level was determined in the 7 days period after surgery. D-dimers can also be increased
6 with the inflammation process induced by surgery and associated tissue damage⁵⁷.

7
8
9 As inflammatory markers, the levels of IL-6 and CRP were monitored during the 8 week period.
10
11 The obtained results for CRP and IL-6 showed that the values didn't increase after surgery
12
13 neither was related with an increasing number of leukocytes (Table 3 and Table 4). In humans,
14
15 IL-6 and CRP level kinetics were inter-related and an increase in CRP level was preceded by an
16
17 IL-6 rising, a well-known inductor of CRP synthesis by hepatocytes and an earlier marker of
18
19 tissue damage⁵⁸⁻⁶⁰. Invasiveness of the surgical procedure is also a factor that can influence the
20
21 CRP and IL-6 levels and their kinetics⁵⁸. In minor surgery or less invasive surgical procedures,
22
23 like the cervical access to carotid artery, might produce a lower level of CRP due to a lower
24
25 degree of tissue trauma. Finally, in both groups and for both measurements (CRP and IL-6), the
26
27 levels consistently decreased after surgery. These values were even lower and different after
28
29 the surgery when compared to time points evaluated before the surgery procedure. This data
30
31 suggests that the surgery performed in our experimental animals did not produced sufficient
32
33 tissue damage to increase the level of CRP and IL-6. Also, PVA/Dx due to the anti-inflammatory
34
35 properties of the dextran component and the well proven biocompatibility of the copolymers
36
37 of PVA with polysaccharides can contribute to those results⁶¹⁻⁶⁴.

38
39 Concerning the CBC results, erythrocytes count, hemoglobin concentration and hematocrit
40
41 values, all values remained between the normal ranges for the species during the 16 week
42
43 period with the exception of group one at time point 6 (12 weeks)^{65,66}. In group one, at 4 days
44
45 post-surgery, it was observed a decrease in the former three parameters but still under the
46
47 normal range that can be attributed to mild blood loss intra-operatively. At time point 6 (Table
48
49 3), it was observed a decrease in those values to under normal range. That evidence can be
50
51 explained by conditions not related to the surgical procedure or PVA vascular prosthesis that
52
53
54
55
56
57
58
59
60

can cause blood depletion. Other parameters, like mean corpuscular volume (MCV) remained under the normal limits for both groups (Table 3 and Table 4). Mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) showed lower values considering the normal limits (8-12 pg and 31-34 g/dL respectively); with the exception of group two (PVA/Dx 7 cm graft) at the first three experimental points (0, 4 and 8 days post-surgery) that presented an inferior MCHC to normal level (31-34 g/dL) and a statistically significant difference for other time points (14 days, 8 and 12 weeks) (Table 4). In spite of these evidence, it cannot be concluded the existence of a hypochromic anemia only based on that parameter, as a matter of fact, the erythrocytes count (9.08 ± 0.92 , 9.54 ± 0.51 , $9.56 \pm 0.62 \times 10^6/\text{mm}^3$) and the hemoglobin concentration (10.44 ± 0.88 , 10.65 ± 0.51 , 10.72 ± 0.46 g/dL) were normal for that time points in group two (PVA/Dx 7cm graft). Also, in blood smears it was not observed spherocytosis or other morphological abnormalities (e.g. schizocytes) associated to physical damage to erythrocytes.

The hematocrit value obtained by the microhematocrit technique was consistently higher than the same parameter obtained by automated cell counter. This phenomenon is explained by the overestimation of true volume of erythrocytes due to the entrapment of plasma in the cellular layer⁶⁷. Also the contribution of leukocytes and platelets for the total volume of erythrocytes can be considered, however their volume in practice is neglected⁶⁷. The hemoglobin measurement stayed under the normal limits for the species during the experimental period. Additionally, the total bilirubin concentration was used as an indirect marker of hemolysis, and it was within normal limits (≤ 0.5 mg/dl) or slightly elevated (0.5-0.7mg/dl) during the 16 weeks healing period for both groups⁶⁸. These results suggest that intravascular hemolysis was negligible and cannot be attributed to PVA vascular grafts as proved before at *in vitro* hemolysis testing that considered this biomaterial as non-hemolytic (data not shown).

The leukogram and in particular the white blood cell (WBC) count remained within the normal limits, being observed a non-significant increase (Table 3) in WBC after surgery (4 days post-surgery)⁶⁹. That rising is most probably connected to the inherent tissue damage and consequent acute inflammation associated with that event. The differential white cell count was also within the normal range for sheep⁶⁶. Platelet count also was observed to be in the normal range, which reflects a poor consumption of platelets by PVA vascular graft. The ratio neutrophil to lymphocyte (N/L) is an inflammatory marker widely used as a prognostic indicator for cardiovascular diseases^{70,71}. In ruminants, the normal value for this parameter is inferior to one due to the larger number of lymphocytes over to neutrophils^[70]. Surprisingly, only in group two, the ratio N/L was superior to one (T0, T1, T2, T3, T4, T5 and T7) which reflects a relative increase of neutrophils to lymphocytes and probably suggests a greater inflammatory milieu surrounding the PVA 7 cm grafts.

4. Conclusions

It has been shown that PVA/Dx membrane tended to suppress the activation and adherence of platelets in contrast to glass and polypropylene. This tendency was also confirmed objectively by the LDH assay. The inert nature and hydrophilicity appeared to dominantly explain the good *in vitro* thrombogenicity results. Also the dextran component of copolymer improved the hemocompatible profile. Quantification of whole blood clotting time and plasma recalcification time results reinforced the good blood-material interactions. The *in vivo* assays confirmed the hemocompatibility verified by the *in vitro* experiments. Inflammatory markers and coagulation assays remained within the normal range for human and sheep during the experimental period. CBC and the correspondent subsets results confirmed the non-inflammatory and non-hemolytic profile for PVA/DX grafts obtained through *in vitro* results.

5. Acknowledgements

This research was supported by QREN I&DT Cluster in Development of Products for Regenerative Medicine and Cell Therapies – Projects Biomat & Cell QREN 2008/1372, co-financed by the European Community FEDER fund through ON2 - O Novo Norte – North Portugal Regional Operational Program 2007-2013, by project FCT – ENMED/0002/2010 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Ministério da Educação e da Ciência and EuroNanoMed JTC 2010 Program, and by the program COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade, Project Pest-OE/AGR/UI0211/2011. Nuno Alexandre has a Doctoral Grant from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Ministério da Educação e da Ciência, Portugal, SFRH/BD/64838/2009. The authors also wish to thank ZEA – Sociedade Unipessoal, Lda, for the help in handling the animals during the experimental periods.

Captions and legends to tables and figures

Table 1 – Quantification of adhered platelets by activity of lactate dehydrogenase assay (mean±SD).

PVA-Polyvinyl alcohol hydrogel, PRP – plasma rich platelet, SD-standard deviation.

Table 2 - Values of TAT generation after incubation with PVA/Dx and controls. Samples were tested in triplicate and results presented as means with standard deviation (mean±SD).

TAT- Thrombin-antithrombin complex, PVA/Dx – Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran.

Table 3 – PVA/Dx vascular grafts (5 cm) *in vivo* coagulation profile, hematology and inflammatory markers results (mean±SD).

PT – Prothrombin time, aPTT –activated partial thromboplastin time, CRP – C-reactive protein, IL-6 – interleukin 6, Hb-hemoglobin, Ht – hematocrit, RBC – red blood cells, MCV – mean corpuscular volume, MCH – mean corpuscular hemoglobin, MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC – white blood cells, N/L – neutrophil/lymphocyte ratio.

Table 4 - PVA/Dx vascular grafts (7 cm) *in vivo* coagulation profile, hematology and inflammatory markers results (mean \pm SD).

PT – Prothrombin time, aPTT –activated partial thromboplastin time, CRP – C-reactive protein, IL-6 – interleukin 6, Hb-hemoglobin, Ht – hematocrit, RBC – red blood cells, MCV – mean corpuscular volume, MCH – mean corpuscular hemoglobin, MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC – white blood cells, N/L – neutrophil/lymphocyte ratio.

Figure 1 – SEM images of platelet adhesion on different surfaces (A) polypropylene, (B) PVA/Dx, (C) silicate glass incubated with PRP from sheep; and the same surfaces (D- polypropylene, E-PVA/Dx, F-silicate glass) incubated with PRP from human origin.

PVA-Polyvinyl alcohol hydrogel, PRP – plasma rich platelet.

Figure 2 – Comparision of the effect of silicate glass, polypropylene and PVA/Dx, incubated with human PRP, on platelet activation. (A) Percentage of CD62P positive platelets; (B) Florescence intensity (arbitrary units). Data are mean \pm s.e.m. *P<0.05, versus silicate glass. Samples were tested in triplicate.

PVA-Polyvinyl alcohol hydrogel, PRP – plasma rich platelet, s.e.m. – standard error mean.

Figure 3 – Whole blood clotting time for PVA/Dx. The positive control (+) used were glass beads and the negative control (-) the polystyrene microtitter plate. Samples were tested in triplicate.

PVA/Dx-Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran.

Figure 4 - The half-max time of each profile was calculated as a measure of the clotting time. Data are presented as mean \pm -SD.* P<0.05 versus TCP. Samples were tested in triplicate.

PVA/Dx-Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran, PRP – plasma rich platelet, TCP - tissue culture-treated plastic, SD-standard deviation.

Figure 5 - Clotting kinetic profiles of the absorbance at 405nm as a function of time for PPP incubated with TCP and PVA/Dx. Citrated PPP (without the addition of calcium) serves as a negative control. Samples were tested in triplicate.

PVA/Dx-Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran, PRP – plasma rich platelet, TCP - tissue culture-treated plastic.

Figure 6 - The slope of the linear portion of each curve was examined as a measure of clotting rate.

PVA/Dx - Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran, TCP - tissue culture-treated plastic.

6. Reference List

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VRL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart Disease and Stroke Statistics–2013 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2013;127:e6-e245.
2. Nomi M, Atala A, Coppi PD, Soker S. Principles of neovascularization for tissue engineering. *Molecular Aspects of Medicine* 2002;23:463-83.
3. Spadaccio C, Rainer A, Barbato R, Chello M, Meyns B. The fate of large-diameter Dacron-vascular grafts in surgical practice: Are we really satisfied? *International journal of cardiology* 2013;168, 5028-5029.
4. Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH. Saphenous Vein Versus PTFE for Above-Knee Femoropopliteal Bypass. A Review of the Literature. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2004;27:357-62.
5. Robinson BI, Fletcher JP, the Australian and New Zealand Femoropopliteal Graft Trial Participants. Fluoropolymer coated Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass grafting: a multicentre trial. *ANZ Journal of Surgery* 2003;73:95-9.
6. Hassan R, Gholam HK, Mohammad Hadi SM, Patricia K. Patency rate and complications of polytetrafluoroethylene grafts compared with polyurethane grafts for hemodialysis access. *Upsala Journal of Medical Sciences* 2010;115:245-248.
7. Vogler EA, Siedlecki CA. Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials* 2009;30:1857-69.
8. Zhuo R, Miller R, Bussard KM, Siedlecki CA, Vogler EA. Procoagulant stimulus processing by the intrinsic pathway of blood plasma coagulation. *Biomaterials* 2005;26:2965-73.

9. Akers DL, Du YH, Kempczinski RF. The effect of carbon coating and porosity on early patency of expanded polytetrafluoroethylene grafts: An experimental study. *Journal of Vascular Surgery* 1993;18:10-5.
10. Liu LS, Ito Y, Imanishi Y. Synthesis and antithrombogenicity of heparinized polyurethanes with intervening spacer chains of various kinds. *Biomaterials* 1991;12:390-6.
11. Meinhart J, Deutsch M, Zilla P. Eight Years of Clinical Endothelial Cell Transplantation Closing the Gap Between Prosthetic Grafts and Vein Grafts. *ASAIO Journal* 1997;43:515-521.
12. Chen H, Zhang Z, Chen Y, Brook MA, Sheardown H. Protein repellent silicone surfaces by covalent immobilization of poly(ethylene oxide). *Biomaterials* 2005;26:2391-9.
13. Abbasi F, Mirzadeh H, Katbab AA. Modification of polysiloxane polymers for biomedical applications: a review. *Polym Int* 2001; 50:1279-87.
14. Koh LB, Rodriguez I, Venkatraman SS. The effect of topography of polymer surfaces on platelet adhesion. *Biomaterials* 2010;31:1533-45.
15. Hassan C, Peppas N. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods
Biopolymers - PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites. In: Springer Berlin / Heidelberg; 2000. p 37-65.
16. Hyon SH, Cha WI, Ikada Y, Kita M, Ogura Y, Honda Y. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 1994; 5: 397-406.
17. Kokabi M, Sirousazar M, Hassan ZM. PVA-clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *European Polymer Journal* 2007;43:773-81.

18. Wang M, Li Y, Wu J, Xu F, Zuo Y, Jansen JA. In vitro and in vivo study to the biocompatibility and biodegradation of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol)/gelatin composite. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008;85:418-26.
19. Kobayashi M, Chang YS, Oka M. A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials* 2005;26:3243-8.
20. Maruoka S, Matsuura T, Kawasaki K, Okamoto M, Yoshiaki H, Kodama M, et al. Biocompatibility of Polyvinylalcohol Gel as a Vitreous Substitute. *Curr Eye Res* 2006;31:599-606.
21. Chaouat M, Le Visage C, Baille WE, Escoubet B, Chaubet F, Mateescu MA, et al. A Novel Cross-linked Poly(vinyl alcohol) (PVA) for Vascular Grafts. *Adv Funct Mater* 2008;18:2855-61.
22. Joshi A, Fussell G, Thomas J, Hsuan A, Lowman A, Karduna A, et al. Functional compressive mechanics of a PVA/PVP nucleus pulposus replacement. *Biomaterials* 2006;27:176-84.
23. Zeerleder S, Mauron T, Lämmle B, Willemin WA. Effect of low-molecular weight dextran sulfate on coagulation and platelet function tests. *Thrombosis Research* 2002;105:441-6.
24. Abir F, Barkhordarian S, Sumpio BE. Efficacy of Dextran Solutions in Vascular Surgery. *Vascular and Endovascular Surgery* 2004;38:483-91.
25. Neu B, Wenby R, Meiselman HJ. Effects of Dextran Molecular Weight on Red Blood Cell Aggregation. *Biophysical journal* 2008;95:3059-3065.
26. Tamada Y, Kulik EA, Ikada Y. Simple method for platelet counting. *Biomaterials* 1995;16:259-61.
27. Motlagh D, Yang J, Lui KY, Webb AR, Ameer GA. Hemocompatibility evaluation of poly(glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27:4315-24.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
28. Tze-Man K, Jui-Che L, Cooper SL. Surface characterization and platelet adhesion studies of plasma-sulphonated polyethylene. *Biomaterials* 1993;14:657-64.
29. Xu M, Qiu J, Lin Y, Shi X, Chen H, Xiao T. Surface biocompatible modification of polypropylene by entrapment of polypropylene-block-poly(vinylpyrrolidone). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010;80:200-5.
30. Sivaraman B, Latour RA. The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount of adsorbed fibrinogen. *Biomaterials* 2010;31:832-9.
31. Cholakis CH, Sefton MV. In vitro platelet interactions with a heparin-polyvinyl alcohol hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research* 1989;23:399-415.
32. Cholakis CH, Zingg W, Sefton MV. Effect of heparin-pva hydrogel on platelets in a chronic canine arterio-venous shunt. *Journal of Biomedical Materials Research* 1989;23:417-41.
33. Godo MN, Sefton MV. Characterization of transient platelet contacts on a polyvinyl alcohol hydrogel by video microscopy. *Biomaterials* 1999;20:1117-26.
34. Kawamoto N, Terano M, Yui N. Blood-contacting properties of polypropylene surfaces. *J Artif Organs* 1998;1:4-9.
35. Lampin M, Warocquier-Clérout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997;36:99-108.
36. Chiumiento A, Lamponi S, Barbucci R. Role of Fibrinogen Conformation in Platelet Activation. *Biomacromolecules* 2006;8:523-31.
37. George JN. Direct Assessment of Platelet Adhesion to Glass: A Study of the Forces of Interaction and the Effects of Plasma and Serum Factors, Platelet Function, and Modification of the Glass Surface. *Blood* 1972;40:862-74.
38. Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes

- Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. Blood 1999;94:3791-9.
39. Hanson SR, Tucker EI. Chapter II.2.6 - Blood Coagulation and Blood-Materials Interactions. In: Buddy DR, Allan S.Hoffman, Frederick JSaJ, Jack E.Lemons, editors. Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press; 2013. p. 551-7.
40. Wu Y, Simonovsky FI, Ratner BD, Horbett TA. The role of adsorbed fibrinogen in platelet adhesion to polyurethane surfaces: A comparison of surface hydrophobicity, protein adsorption, monoclonal antibody binding, and platelet adhesion. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2005;74A:722-38.
41. Leitão AF, Gupta S, Silva JP, Reviakine I, Gama M. Hemocompatibility study of a bacterial cellulose/polyvinyl alcohol nanocomposite. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2013;111:493-502.
42. Andrade FK, Silva JP, Carvalho M, Castanheira EMS, Soares R, Gama M. Studies on the hemocompatibility of bacterial cellulose. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2011;98A:554-66.
43. Zhuo R, Siedlecki CA, Vogler EA. Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces. Biomaterials 2006;27:4325-32.
44. Motlagh D, Yang J, Lui KY, Webb AR, Ameer GA. Hemocompatibility evaluation of poly(glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering. Biomaterials 2006;27:4315-24.
45. Rhodes NP, Williams DF. Plasma recalcification as a measure of contact phase activation and heparinization efficacy after contact with biomaterials. Biomaterials 1994;15:35-7.
46. Minnema MC, ten Cate H, Hack CE. The Role of Factor XI in Coagulation: A Matter of Revision. Semin Thromb Hemost 1999;25:419-28.

47. Burman JF, Chung HI, Lincoln JCR, Lane DA, Philippou H, Adami A. Role of factor XII in thrombin generation and fibrinolysis during cardiopulmonary bypass. *Lancet* 1994;344:1192-3.
48. van der Kamp KWHJ, van Oeveren W. Factor XII fragment and kallikrein generation in plasma during incubation with biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research* 1994;28:349-52.
49. Boisclair MD, Lane DA, Philippou H, Esnouf MP, Sheikh S, Hunt B, et al. Mechanisms of thrombin generation during surgery and cardiopulmonary bypass [see comments]. *Blood* 1993;82:3350-7.
50. Irvine L, Sundaram S, Courtney JM, Taggart DP, Wheatley DJ, Lowe GDO. Monitoring of Factor XII Activity and Granulocyte Elastase Release During Cardiopulmonary Bypass. *ASAIO Journal* 1991;37:537-676.
51. Gentry P, Burgess H, Wood D. Chapter 10 - Hemostasis. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (Sixth Edition). San Diego: Academic Press; 2008. p. 287-330.
52. Gentry PA. Comparative aspects of blood coagulation. *The Veterinary Journal* 2004;168:238-51.
53. Hong J, Nilsson Ekdahl K, Reynolds H, Larsson R, Nilsson B. A new in vitro model to study interaction between whole blood and biomaterials. *Studies of platelet and coagulation activation and the effect of aspirin. Biomaterials* 1999;20:603-11.
54. Hoke M, Koppensteiner R, Schillinger M, Haumer M, Minar E, Wiesbauer F, et al. D-dimer testing in the diagnosis of transfemoral pseudoaneurysm after percutaneous transluminal procedures. *Journal of Vascular Surgery* 2010;52:383-7.
55. Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood* 2009;113:2878-87.

- 1
2
3 56. Dindo D, Breitenstein S, Hahnloser D, Seifert B, Yakarisik S, Asmis LM, et al. Kinetics of
4 D-dimer after general surgery. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 2009;20:347-352.
5
6
7 57. Iba T, Gando S, Murata A, Kushimoto S, Saitoh D, Eguchi Y, et al. Predicting the Severity
8 of Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)-Associated Coagulopathy With
9 of Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)-Associated Coagulopathy With
10 Hemostatic Molecular Markers and Vascular Endothelial Injury Markers. *Journal of*
11 Trauma and Acute Care Surgery 2007;63:1093-1098.
12
13
14 58. Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van DJ, Shenkin A. Response of serum
15 interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond)*
16 1990;79:161-5.
17
18 59. Du Clos TW. Pentraxins: Structure, Function, and Role in Inflammation. *ISRN Inflamm*
19 2013;2013:379-400.
20
21
22 60. Chiaradia E, Avellini L, Tartaglia M, Gaiti A, Just I, Scoppetta F, et al. Proteomic
23 evaluation of sheep serum proteins. *BMC Vet Res* 2012;8:66.
24
25
26 61. de Souza Costa-Junior E, Pereira M, Mansur H. Properties and biocompatibility of
27 chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *Journal of*
28 Materials Science: Materials in Medicine 2009;20:553-61.
29
30
31 62. Besednova NN, Zaporozhets TS, Makarenkova ID, Kuznetsova TA, Kryzhanoskii SP,
32 Zvyagintseva TN, et al. Anti-inflammatory effects of sulphated polysaccharides
33 extracted from brown marine algae. *Biol Bull Rev* 2012;2:525-32.
34
35
36 63. Abed A, Assoul N, Ba M, Derkaoui SM, Portes P, Louedec L, et al. Influence of
37 polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based
38 hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2011;96A:535-42.
39
40
41 64. Alhosseini SN, Moztarzadeh F, Mozafari M, Asgari S, Dodel M, Samadikuchaksaraei A,
42 et al. Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous
43 scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *Int J*
44 Nanomedicine 2012;7:25-34.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
65. Polizopoulou ZS. Haematological tests in sheep health management. *Small Ruminant Research* 2010;92:88-91.
66. Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's Veterinary Hematology*. Wiley; 2011.
67. Stott RA, Hortin GL, Wilhite TR, Miller SB, Smith CH, Landt M. Analytical artifacts in hematocrit measurements by whole-blood chemistry analyzers. *Clinical Chemistry* 1995;41:306-11.
68. Tennant BC, Center SA. Chapter 13 - Hepatic Function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (Sixth Edition). San Diego: Academic Press; 2008. p. 379-412.
69. Wilhelmi MH, Tiede A, Teebken OE, Bisdas T, Haverich A, Mischke R. Ovine Blood: Establishment of a List of Reference Values Relevant for Blood Coagulation in Sheep. *ASAIO Journal* 2012;58:79-82.
70. Harvey JW. *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*. Elsevier Health Sciences; 2011.
71. Bhat T, Teli S, Rijal J, Bhat H, Raza M, Khoueiry G, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and cardiovascular diseases: a-review. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2012;11:55-9.

Table 1 – Adhered platelets results quantified by activity of lactate dehydrogenase (mean±SD).

Biomaterial	PRP sheep (n=3) (x 10 ³ /mm ³)	PRP human (n=3) (x 10 ³ /mm ³)	% of adhered platelets as compared to glass -sheep (n=3)	% of adhered platelets as compared to glass -human (n=3)
PVA/Dx	0.44 ± 0.35*	1.31 ± 1.06*	16.73%	27.87%
Polypropylene	0.84 ± 0.56*	0.56 ± 0.74*	31.93%	11.91%
Glass	2.63 ± 1.65	4.70 ± 1.23	100%	100%

PRP – plasma rich platelet, PVA/Dx – polyvinyl alcohol hydrogel, SD – standard deviation.

*P<0.05 versus glass.

Table 2 - Values of TAT generation after incubation with PVA/Dx and controls. Samples were tested in triplicate and results presented as means with standard deviation (mean±SD).

Biomaterial	TAT
PVA/Dx	6.65±0.62* ng/ml
Polypropylene	12.01±3.77 ng/ml
Glass	13.09±4.91 ng/ml

TAT- Thrombin-antithrombin complex, PVA/Dx – Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran. * P<0.05 versus polypropylene and glass.

Table 3 – PVA/Dx vascular grafts (5 cm) in vivo coagulation profile, hematology and inflammatory markers results (mean±SD).

Time point	T0 (0 day) (n=7)	T1 (4 day) (n=7)	T2 (8 days) (n=7)	T3 (14 days) (n=7)	T4 (4 weeks) (n=7)	T5 (8 weeks) (n=6)	T6 (12 weeks) (n=5)	T7 (16 weeks) (n=4)
PT (s)	29.91±2.16	25.00±1.78	31±1.18	33.91±1.40	30.94±2.22	29.26±1.61	28.17±2.89	38.50±1.71
aPTT (s)	28.70±4.62	26.22±5.57	27.75±4.45	31.92±3.53	25.41±1.71	27.63±2.68	23.70±3.29	25.55±1.76
CRP (ng/ml)	64.49±15.15	51.75±10.17	37.60±4.83	59.63±6.92	61.65±8.48	82.45±26.32	NM	NM
IL6 (pg/ml)	0.24±0.21	0.13±0.21	0.16±0.13	0.19±0.11	0.084±0.06	0.08±0.06	NM	NM
D-dimers (ng/ml)	162.19±66.74	291.80±357.30	227.00±210.44	142.62±72.54	170.51±151.32	186.87±145.72	NM	NM
Hb (g/dl)	11.00±0.31	10.38±0.42	10.78±0.46	10.80±0.27	10.82±0.29	11.25±0.42	9.10±0.51	10.40±0.11
Ht (%)	30.11±0.74	27.21±1.06	28.28±3.67	28.25±0.82	28.85±0.61	31.55±1.19	23.85±1.58 a b)	24.80±2.30
Microhematocrit (%)	35.71±1.35	33.42±1.36	33.14±3.89	31.71±0.99	36.42±1.57	38.33±1.38	29.75±2.56 a b)	30.33±1.45
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	9.34±0.27	8.70±0.30	9.08±1.14	8.90±0.31	9.19±0.18	9.32±0.43	7.79±0.65	8.43±0.47
MCV (fl)	32.37±0.72	31.97±0.81	32.34±1.77	32.30±0.86	36.82±2.99	39.46±2.33	30.82±0.73	33.76±3.31
MCH (pg)	11.75±0.32	11.85±0.37	11.84±0.56	12.12±0.29	11.74±0.21	11.88±0.46	11.70±0.37	14.70±3.05
MCHC (g/dl)	36.41±0.35	37.52±0.51	36.82±2.24	37.75±0.61	33.14±2.34	33.15±2.88	38.45±0.83	42.70±4.39 a b)
WBC Total (x10 ³ /mm ³)	7.41±0.89	9.73±1.65	8.83±3.24	9.26±1.27	8.66±1.01	7.50±0.35	5.89±0.93	5.29±0.52
Neutrophils (x10 ³ /mm ³)	2.09±0.29	2.65±0.53	2.25±0.75	2.52±0.33	2.70±0.54	3.33±0.53	2.32±0.36	1.40±0.20
Lymphocyte (x10 ³ /mm ³)	4.11±2.15	5.56±1.21	5.08±2.68	4.64±0.98	4.37±0.83	3.79±0.22	2.67±0.51	3.06±0.44
Platelets (x10 ³ /mm ³)	298.57±23.71	286.28±23.62	339.85±44.48	317.85±28.04	313.14±49.98	338.00±40.15	236.75±35.52	220.00±57.16
N/L ratio	0.61±0.11	0.61±0.12	0.58±0.12	0.74±0.16	0.77±0.16	0.90±0.15	0.92±0.13	0.48±0.10
Total Bilirubin (mg/dl)	0.61±0.04	0.54±0.01	0.56±0.01	0.87±0.13	0.60±0.02	0.50±0.01	0.52±0.02	0.54±0.02

PT – Prothrombin time, aPTT –activated partial thromboplastin time, CRP – C-reactive protein, IL-6 – interleukin 6, Hb-hemoglobin, Ht – hematocrit, RBC – red blood cells, MCV – mean corpuscular volume, MCH – mean corpuscular hemoglobin, MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC – white blood cells, N/L – neutrophil/lymphocyte ratio.

NM- not made. a) $p < 0.05$ vs. T4; b) $p < 0.05$ vs. T5.

Table 4 – PVA/Dx vascular grafts (7 cm) in vivo coagulation profile, hematology and inflammatory markers results (mean±SD).

Time point	T0 (0 day) (n=7)	T1 (4 days) (n=7)	T2 (8 days) (n=7)	T3 (14 days) (n=7)	T4 (4 weeks) (n=7)	T5 (8 weeks) (n=6)	T6 (12 weeks) (n=5)	T7 (16 weeks) (n=4)
PT(s)	37.84±3.00	37.50±3.217	33.84±3.11	36.88±2.89	39.15±2.58	38.50±3.21	36.98±2.84	35.36±2.93
aPTT (s)	28.55±2.44	26.94±2.44	25.08±2.38	24.64±2.28	28.31±1.37	25.08±2.08	26.75±1.32	26.61±1.33
CRP (ng/ml)	56.41±17.77	42.79±7.36	59.63±12.74	38.61±2.98	40.23±5.61	67.88±12.60	NM	NM
IL6 (pg/ml)	0.07±0.04	0.006±0.006	0.081±0.064	0.048±0.026	0.338±0.237	0.048±0.030	NM	NM
D-dimers (ng/ml)	292.53±168.42	322.32±306.280	232.90±165.95	230.837±193.08	208.77±95.83	266.97±124.46	NM	NM
Hb (g/dl)	10.44±0.88	10.65±0.51	10.72±0.46	10.77±0.541	9.64±1.86	10.200±0.66	9.94±0.754	11.07±0.89
Ht (%)	32.65±2.21	30.08±2.09	28.67±1.84	27.60±1.36	27.72±4.93	27.21±1.72	25.36±2.02	30.40±2.46
Microhematocrit (%)	36.85±2.89	36.42±1.64	37.28±2.25	32.71±1.18	33.57±2.19	31.33±2.43	28.80±1.59	37±2.46
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	9.08±0.92	9.54±0.51	9.56±0.62	9.05±0.48	8.76±0.46	8.61±0.56	8.47±0.65	9.96±0.82
MCV (fl)	39.04±1.63	38.60±1.59	39.98±1.94	32.35±1.96	34.11±2.43	31.95±0.67c)	31.44±1.150c)	30.62±0.70
MCH (pg)	11.20±0.25	26.44±15.26	11.27±0.33	11.65±0.31	10.94±0.32	11.90±0.44	12.26±0.36	11.05±0.24
MCHC (g/dl)	29.02±1.16	29.52±1.47	28.47±1.69	38.87±0.84a)b)c)	34.27±1.20	37.41±0.81 a)b)	39.14±0.88 a)b)c)	36.32±0.90
WBC Total (x10 ³ /mm ³)	5.79±0.80	6.60±0.94	6.71±0.91	7.28±1.24	6.63±1.33	6.22±0.99	6.64±0.57	7.92±1.15
Neutrophile (x10 ³ /mm ³)	2.58±0.37	3.00±0.61	2.56±0.26	2.81±0.32	3.67±0.75	2.91±0.60	1.80±0.50	3.27±0.81
Lymphocyte (x10 ³ /mm ³)	2.93±0.50	2.84±0.50	3.24±0.86	3.40±0.97	2.54±0.51	2.15±0.27	3.44±0.46	3.02±0.42
Platelets (x10 ³ /mm ³)	289.28±29.44	305.57±33.97	352.71±36.23	461.57±52.57	309.28±43.78	327.00±21.58	361.40±48.22	327.25±35.03
N/L ratio	0.99±0.13	1.14±0.19	1.01±0.16	1.04±0.20	1.47±0.13	1.34±0.18	0.58±0.17d)	1.13±0.22
Total Bilirubin (mg/dl)	0.71±0.07	0.59±0.08	0.59±0.00	0.50±0.00	0.72±0.14	0.63±0.02	0.65±0.06	0.64±0.07

PT – Prothrombin time, aPTT –activated partial thromboplastin time, CRP – C-reactive protein, IL-6 – interleukin 6, Hb-hemoglobin, Ht – hematocrit, RBC – red blood cells, MCV – mean corpuscular volume, MCH – mean corpuscular hemoglobin, MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC – white blood cells, N/L – neutrophil/lymphocyte ratio. NM- not made. a) p<0.05 vs. T0; b) p<0.05 vs. T1; c) p<0.05 vs. T2; d) p<0.05 vs. T4.

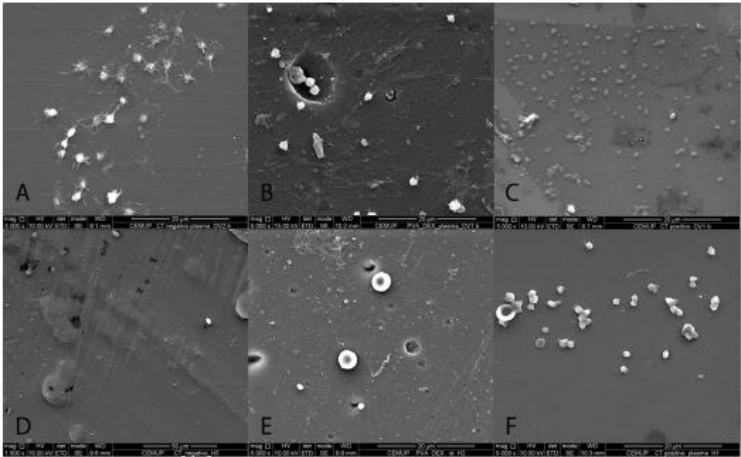


Figure 1 – SEM images of platelet adhesion on different surfaces (A) polypropylene, (B) PVA/Dx, (C) silicate glass incubated with PRP from sheep; and the same surfaces (D-polypropylene, E-PVA/Dx, F-silicate glass) incubated with PRP from human origin.
PVA/Dx - Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran, PRP - platelet rich plasma, SEM - Scanning electron microscopy
316x194mm (96 x 96 DPI)

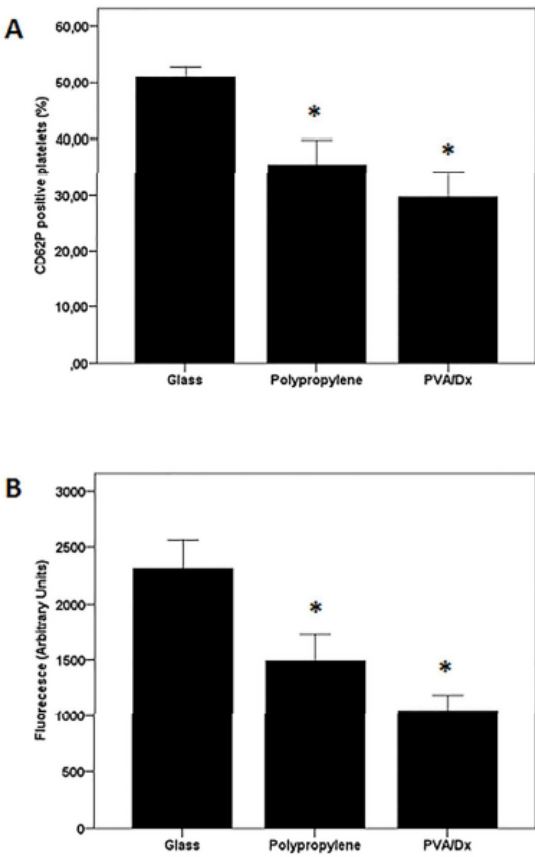


Figure 2 – Comparison of the effect of silicate glass, polypropylene and PVA/Dx, incubated with human PRP, on platelet activation. (A) Percentage of CD62P positive platelets; (B) Florescence intensity (arbitrary units). Data are mean +/- s.e.m. *P<0.05, versus silicate glass. Samples were tested in triplicate. PVA/Dx - Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran, PRP - platelet rich plasma 200x270mm (200 x 200 DPI)

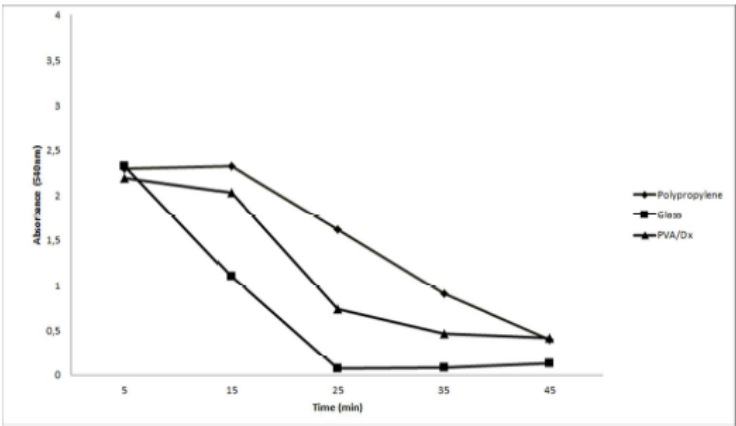


Figure 3 – Whole blood clotting time for PVA/Dx. The positive control (+) used were glass beads and the negative control (-) the polystyrene microtiter plate. Samples were tested in triplicate.
PVA/Dx-Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran

306x175mm (72 x 72 DPI)

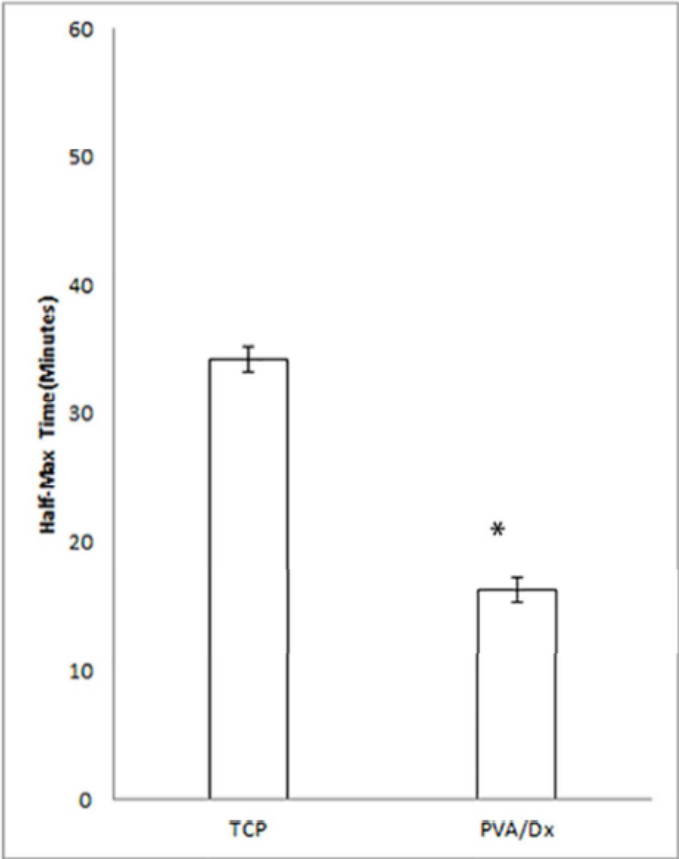


Figure 4 - The half-max time of each profile was calculated as a measure of the clotting time. Data are presented as mean+/-SD.* P<0.05 versus TCP. Samples were tested in triplicate.
PVA/Dx-Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran, PRP - plasma rich platelet, TCP - tissue culture-treated plastic

197x250mm (72 x 72 DPI)

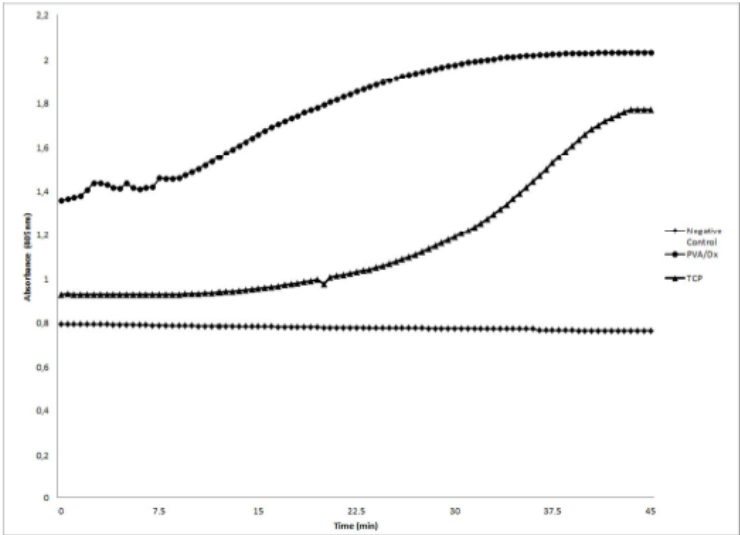


Figure 5 - Clotting kinetic profiles of the absorbance at 405nm as a function of time for PPP incubated with TCP and PVA/Dx. Citrated PPP (without the addition of calcium) serves as a negative control. Samples were tested in triplicate.

PVA/Dx-Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran, PRP – plasma rich platelet, TCP - tissue culture-treated plastic

350x254mm (72 x 72 DPI)

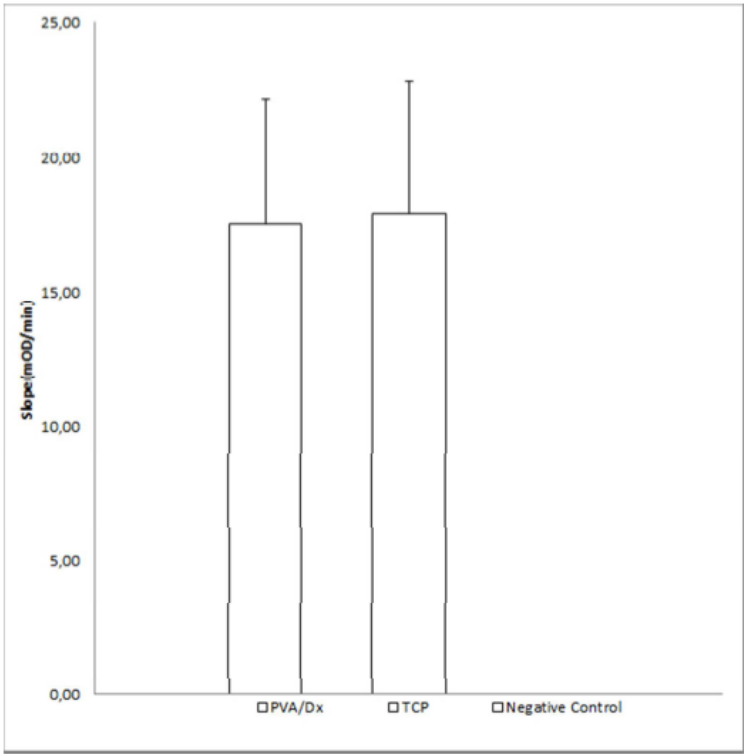


Figure 6 - The slope of the linear portion of each curve was examined as a measure of clotting rate. PVA/Dx - Polyvinyl alcohol hydrogel/dextran, TCP - tissue culture-treated plastic.

206x208mm (72 x 72 DPI)

1.4. Conclusões

Os ensaios *in vitro* e *in vivo* de biocompatibilidade, de hemocompatibilidade e de trombogenicidade da celulose bacteriana e do PVA/Dx permitiram obter as seguintes conclusões:

- I. O PVA/Dx isoladamente ou em associação com MSCs é um biomaterial ligeiramente irritante para os tecidos circundantes de acordo com a norma ISO 10993-6 (Anexo E) e consequentemente é considerado um material biocompatível que pode ser usado no fabrico de próteses vasculares;
- II. A interacção do PVA/Dx com sangue avaliada pelo ensaio de determinação de hemólise demonstrou que este biomaterial é não hemolítico;
- III. Demonstrou-se que o biomaterial PVA/Dx tende a suprimir a activação e adesão de plaquetas em contraste com vidro e polipropileno. Essa tendência também foi confirmada objectivamente pelo ensaio de LDH. Os resultados da quantificação do tempo de coagulação de sangue total e dos perfis do tempo de recalcificação do plasma reforçaram o perfil de hemocompatibilidade do PVA/Dx;
- IV. Os ensaios *in vivo* confirmaram a hemocompatibilidade demonstrada *in vitro*. Os marcadores inflamatórios e da coagulação mantiveram-se dentro dos limites normais durante o período experimental. Os resultados do hemograma confirmaram igualmente o perfil não-inflamatória e não-hemolítico das próteses vasculares de PVA/Dx.
- V. Os implantes de celulose bacteriana (CB) foram considerados ligeiramente mais irritantes para os tecidos do que as membranas de ePTFE.
- VI. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas para o grau de inflamação entre os implantes de CB e CB revestidos com péptidos RGD.

2. Avaliação funcional e estrutural das próteses vasculares de PVA/Dx num modelo animal

2.1. Introdução

A avaliação funcional e estrutural das próteses vasculares de pequeno diâmetro(< diâmetro interno) através de testagem *in vivo* é uma etapa fundamental dos ensaios pré-clínicos. A utilização do modelo experimental de interposição da prótese vascular num segmento da artéria carótida é um modelo válido para avaliação do desempenho funcional (Byrom et al., 2010) de próteses sintéticas baixo diâmetro. Neste trabalho, utilizou-se um modelo animal de grande porte, a ovelha, com uma anatomia e fisiologia vascular semelhante ao homem. O sistema de coagulação da ovelha é semelhante ao homem (Bianco et al., 2013a) permitindo por isso a sua utilização igualmente como modelo de trombogenicidade aguda para próteses vasculares. No desenho deste trabalho experimental seguiram-se as linhas orientadoras da norma ISO 7198-1 e 2 (ISO, 1994). Desta forma, optou-se por realizar um ensaio a longo prazo com uma duração máxima de 24 semanas por ser um período experimental suficientemente para avaliar o desempenho estrutural ao nível da endotelização de superfícies e formação de hiperplasia da íntima (Soldani et al., 2010). Optou-se igualmente pela artéria carótida comum como local de implantação por esta apresentar um diâmetro mais concordante com o diâmetro da nossa prótese (diâmetro interno 5 mm), por estar facilmente acessível à monitorização funcional por ecografia e por permitir um acesso cirúrgico isento de complicações. A concordância de diâmetros é uma variável importante no planeamento deste ensaio, pois podemos induzir de forma artificial um fluxo turbulento no local das anastomoses e consequentemente podemos causar artificialmente hiperplasia da íntima (Sunamura et al., 2007). Este local de implantação permitiu ainda simular as técnicas de revascularização que se realizam na prática clínica através de uma anastomose por sutura término-terminal num local de fluxo elevado utilizando uma prótese de pequeno diâmetro. A monitorização funcional da prótese foi realizada através de ecografia em modo B e *Doppler*. O estudo funcional consistiu numa monitorização em diversos pontos temporais durante o período experimental de 24 semanas, medindo-se diversos parâmetros do fluxo sanguíneo e da estrutura da prótese (ex: diâmetro interno).

Após a eutanásia dos animais procedeu-se a colheita das próteses e tecidos envolventes com o objectivo de avaliar macroscopicamente as principais complicações decorrentes da utilização destes dispositivos nomeadamente: formação de aneurismas, oclusão parcial ou total do lúmen. As amostras foram também estudadas pela histologia clássica e por técnicas de imunohistoquímica com o objectivo de evidenciar as células endoteliais presentes no lúmen da prótese através do anticorpo monoclonal CD31(De Visscher, Plusquin, Mesure, & Flameng, 2010; Ramos-Vara et al., 2008; Brodersen et al., 1998) e

os macrófagos presentes nos tecidos envolventes da prótese com o anticorpo CD14(Brodersen et al., 1998).

2.2. Artigo 4

**Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials (2014)
(Submitted)**

**LONG TERM PERFORMANCE EVALUATION OF SMALL-DIAMETER VASCULAR
GRAFTS BASED ON POLYVINYL ALCOHOL HYDROGEL AND DEXTRAN.**



Journal of Biomedical
Materials Research
Part B: Applied Biomaterials

**Long term performance evaluation of small-diameter
vascular grafts based on polyvinyl alcohol hydrogel and
dextran.**

Journal:	<i>Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials</i>
Manuscript ID:	JBMR-B-14-0189
Wiley - Manuscript type:	Original Research Report
Date Submitted by the Author:	21-Mar-2014
Complete List of Authors:	<p>Alexandre, Nuno; Universidade de Évora, Departamento de Zootecnia Pereira, Tiago; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Departamento de Clínicas Veterinárias; Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares (ICETA), Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA)</p> <p>Amorim, Irina; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto (UP), Departamento de patologia e imunologia molecular; Instituto Português de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto ,</p> <p>Rêma, Alexandra; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Departamento de Patologia e de Imunologia Molecular</p> <p>Gonçalves, Ana; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Departamento de Patologia e de Imunologia Molecular</p> <p>Valadares, Guilherme; Internvet,</p> <p>Costa, Elisio; Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas; Universidade do Porto, Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC)</p> <p>Santos-Silva, Alice; Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas</p> <p>Rodrigues, Miguel; Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, CEMUC, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais</p> <p>Almeida, André; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Departamento de Clínicas Veterinárias; Instituto Português de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto , Centro de Estudos de Ciência Animal</p> <p>Lopes, Maria; Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, CEMUC, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais</p> <p>Santos, J D; Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, CEMUC, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais</p> <p>Mauricio, Ana Colette; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Departamento de Clínicas Veterinárias; Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares (ICETA), Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA)</p> <p>Luis, Ana; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade</p>

John Wiley & Sons, Inc.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	do Porto, Departamento de Clínicas Veterinárias; Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares (ICETA), Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA)
Keywords:	PVA, Dextran, vascular, Graft, Small diameter

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review

Title: Long term performance evaluation of small-diameter vascular grafts based on polyvinyl alcohol hydrogel and dextran.

Nuno Alexandre^{1,2*}, Tiago Pereira^{3,4}, Irina Amorim^{6,7}, Alexandra Rêma⁶, Ana Gonçalves⁶,
Guilherme Valadares⁸, Elísio Costa^{9,10}, Alice Santos-Silva^{9,10}, Miguel Rodrigues⁵, André
Almeida^{3,4}, Maria Ascensão Lopes⁵, José Domingos Santos⁵, Ana Colette Maurício^{3,4},
Ana Lúcia Luís^{3,4},

¹ Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Apartado 94,
7002-554, Évora, Portugal

² Instituto de Ciências Agro-ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Pólo da Mitra,
Apartado 94, 7002-554, Évora, Portugal

³ Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Instituto de Ciências e Tecnologias
Agrárias e Agro-Alimentares (ICETA), Rua D. Manuel II, Apartado 55142, 4051-401,
Porto, Portugal.

⁴ Departamento de Clínicas Veterinárias, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar (ICBAS), Universidade do Porto (UP), Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228,
4050-313 Porto, Portugal.

⁵ CEMUC, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais, Faculdade de
Engenharia, Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias s/n, 4200-465 Porto,
Portugal.

⁶ Departamento de Patologia e de Imunologia Molecular, Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto (UP), Rua de Jorge
Viterbo Ferreira, nº 228, 4050-313 Porto, Portugal.

⁷ Instituto Português de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto
(IPATIMUP), Rua Dr. Roberto Frias s/n, 4200-465 Porto, Portugal.

⁸ Intervet, Rua Academia Recreativa Santo Amaro, nº 13, 1300-001 Lisboa, Portugal

⁹ Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto (UP), Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228, 4050-313 Porto, Portugal.

¹⁰ Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Universidade do Porto (UP), Rua do Campo Alegre, nº823, 4150 Porto, Portugal.

* Corresponding author:

Nuno Alexandre

Universidade de Évora, Departamento de Zootecnia, Pólo da Mitra, Apartado 94,

7002-554, Évora, Portugal

Email: nmla@uevora.pt

Fax: +351 266 760 841

Phone: +351 266 760 82

Abstract

The cardiovascular research efforts have been directed for finding a synthetic small diameter vascular graft (SDVG) with an improved performance when compared to the autologous graft. The objective of this *in vivo* study was to assess the functional and structural performance of a novel compliant SDGV fabricated by the copolymerization of polyvinyl alcohol hydrogel (PVA) with low molecular weight dextran (Dx). 5 cm PVA plus Dx grafts were implanted in the left common carotid of sheep and compared to standard ePTFE grafts of the same size and length. One PVA/Dx graft implanted group also received peri-graft injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from the umbilical cord Wharton's jelly (WJ). The *in vivo* testing demonstrated that PVA/Dx grafts have the potential to maintain a similar patency rate (PR) like ePTFE grafts over a 24 week period. Power Doppler studies find out that was possible to keep a laminar flow in PVA/Dx grafts with systolic and diastolic velocities comparable to the ePTFE grafts. The structural performance was also assessed in explanted grafts either by digital imaging analysis of immunostained tissues and by histological analysis. CD14 and α -actin staining presented similar results in PVA/Dx/MSCs and PTFE grafts. Fibrosis layer measurements were lower in PVA/Dx/MSCs grafts and it was observed a higher PR. Endothelial cells were only detected at graft-artery transitions, at 12 and 16 weeks in PVA/Dx/MSCs groups. PVA/Dx can be an excellent candidate scaffold in mechanically challenging applications, such as SDVGs, especially when associated to MSCs from WJ.

Key Words: PVA, Dextran, Vascular, Graft, Small diameter, Mesenchymal stem cells, ovine model

1. Introduction

The need of small diameter vascular grafts (SDVG) for clinical application increased together with the cardiovascular diseases in past decades¹. For the treatment of some of the cardiovascular pathologies, the peripheral revascularization procedures are usually performed. The autologous saphenous vein or arm veins are currently the first choice for use in infraginal arterial reconstruction and aortic coronary bypass grafting procedures. If arterial homografts such as the internal mammary, radial and hypogastric arteries are available for grafting, their use should be preferred to autologous vein for coronary bypass grafting due to superior patency rate at 1 year post-procedure². Nevertheless, up to 30%, of the patients who require arterial bypass surgery do not possess suitable or sufficient autologous blood vessels, and in these cases the use of an artificial vascular graft is required³. Polyethylene-terephthalate (PET) and expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) are currently used for prosthetic vascular grafts providing satisfactory results when used to replace or by-pass large diameter blood vessels. However, the clinical performance of those biomaterials in small-diameter vascular grafts are poor concerning the patency rate when compared to autologous vein grafts⁴. PET and ePTFE used for femoropopliteal bypass grafting, presented respectively a patency rate of 36% and 47% after 2 years of implantation³. Despite of an overall similar patency rate, ePTFE has a higher primary patency rate supporting the preferential use of ePTFE in patients with critical limb ischaemia, especially when a below-knee distal anastomosis where smaller diameter graft is required⁵. A long term retrospective study compared the performance of ePTFE and vein grafts for bypass procedures during 5 years and concluding that the patency rate was clearly inferior for ePTFE (74% vs 39%)⁴. Endothelialization of graft surface using endothelial cell auto-transplantation from the patient has become a successful procedure to improve the long term patency rate in artificial vascular grafts. In fact, after a 7 year follow-up period, the primary patency rate for ePTFE endothelialized grafts remained at 73.8%, a value similar with that accomplished by using vein grafts⁶. Despite of the clinical success, is a two-stage procedure that takes several days to achieve a confluent layer of endothelial cells precluding its use in emergency situations⁶. Among the described advantages, artificial grafts are rigid compared to the elastic host artery. The poor mechanical characteristics (compliance) and the lack of endothelial cells lining the lumen of such artificial grafts are clearly the factors that most contributed to their poor patency rates.

More recently, polyurethane (PU) has been used into vascular grafts, known for its elasticity and greater compliance when compared with PET or ePTFE. These properties have been

suggested to result in less intimal hyperplasia at anastomotic site and potentially a better patency rate than the former mentioned biomaterials. However, it was not demonstrated by the more recently clinical reports that PU grafts had a superior patency rate when compared to ePTFE⁷.

Cryopreserved allografts were also an option to replace prosthetic grafts specially the infected ones⁸. The cryopreserved allografts maintained their native viscoelastic functions when preserved by vitreous cryopreservation^{9,10}. A key advantage associated with the use of allografts is the fact that they are relatively more abundant than autografts and more likely to possess adequate biomechanical properties to function efficiently in the recipient. Conversely, there are common problems associated with the use of this technique primarily being an increased risk of disease transmission between individuals. Further, Oschner and co-workers studied the use of such grafts and identified that rejection was a common occurrence in some patients¹¹. The antigenicity of the cryopreserved grafts is not decreased by the process of cryopreservation as evidenced by *in vivo* studies¹². More recently, tissue engineered blood vessels have been developed using autologous cells and a technique termed sheet-based tissue engineering. L'Heureux and co-workers were able to produce autologous tissue-engineered blood vessels with physiologic mechanical properties^{13, 14}. No synthetic or exogenous materials were used; instead, the vessels were created with the use of autologous fibroblasts and endothelial cells harvested from a small biopsy of skin and superficial vein. They reported the preliminary use of these tissue-engineered blood vessels in an adult arterial model. The arteriovenous shunts of 10 patients subject to hemodialysis that were failing were enrolled in this study and 6 of out of 10 tissue-engineered implants remained patent for a period greater than 1 year^{14, 15}.

Due to the poor performance of currently used biomaterials, a large variety of polymers or copolymers, have been evaluated for the development of synthetic vascular grafts without success. PVA is a water-soluble synthetic polymer with several applications in the biomedical field¹⁶. This polymer is produced by polymerization of vinyl acetate to poly (vinyl) acetate followed by hydrolysis of polyvinyl acetate to polyvinyl alcohol. PVA must be cross-linked in order to be useful for a wide variety of applications in areas of medicine and pharmaceuticals sciences. Initially PVA was used in food chemistry and waste water bids, nowadays; it has been widely used for biomedical applications including contact lenses, wound dressings, local drug delivery systems and catheters^{17, 18, 19}. More recently, other biomedical applications were tested under experimental conditions like vascular grafts, artificial meniscus, intervertebral disc prosthesis, and also as a vitreous substitute²⁰⁻²³. PVA was also been used as a scaffold for

1 biosynthetic cartilage^{24, 25}. With the aim of improving hemocompatibility, PVA grafts were
2 synthesized by copolymerization with dextran. Dextran (Dx) is a polysaccharide with multiple
3 effects in coagulation homeostasis including platelet activation inhibition²⁶, diminished fibrin
4 polymerization²⁷, decreased blood viscosity²⁸ and decreased erythrocyte Rouleaux formation²⁹
5 that can improve hemocompatibility if associated to other biomaterials like PVA. Depending on
6 the type of additives included, PVA hydrogels can be considered biocompatible and are non-
7 irritating to soft tissues, making them suitable for many biomedical applications. In fact, the
8 copolymer PVA/Dx has been previously tested for biocompatibility in the same animal model –
9 the ovine model - and it was considered non-irritant³⁰. Despite of already has been tested as a
10 vascular graft, this biomaterial was never been tested in animals with a physiology and a
11 coagulation system so close to humans like the ovine²². The purpose of this *in vivo* study was
12 to assess the functional and structural performance of PVA plus dextran (PVA/Dx) grafts as a
13 small diameter vascular graft (< 6 mm). In this study grafts with 5 cm length were implanted in
14 the common carotid artery of adult sheep using similar anastomotic techniques clinically
15 adopted for peripheral or aorta-coronary bypass procedures. PVA/Dx grafts were compared to
16 ePTFE grafts of the same diameter and length, implanted in the left common carotid artery. In
17 order to evaluate the effect of mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from the Wharton's
18 jelly (WJ) of the umbilical cord (UC) applied in the regenerating endothelium, increasing the
19 biointegration and functional performance of the synthetic grafts, PVA/Dx grafts were also
20 assessed in association with this cellular system by peri-graft injection.

2. Materials and methods

2.1 PVA plus dextran graft manufacturing and reference graft material

21 For the PVA/Dx grafts production, two initial solutions were prepared. A 20% (w/v) PVA (Sigma
22 Aldrich® Mowiol® 10-98) solution was prepared and mixed with a 1% dextran (Sigma Aldrich®
23 molecular weight 64000-76000 daltons) at a Dx/PVA proportion of 10/90 (v/v). The final
24 solution was uniformly mixed and the air bubbles were removed through ultrasound. This
25 solution was poured to the graft molds and subject to physical reticulation through three
26 cycles of freeze/thawing. The freezing/thawing stages were carried out at – 30°C and at 25°C
27 respectively. Afterwards the grafts were subject to the annealing process that consisted in
28 placing the tubes at 25°C for 14 hours. After that period the temperature was increased to a
29 target value of 80°C, at a heating rate of 0.1°C/min. When the desired temperature was
30 obtained, the grafts stayed at that temperature for 20 hours. Following the annealing process,
31 grafts were placed in distilled water for hydration. The grafts were posteriorly treated with

NaOH with a concentration of 1N for 2.30 hours at 37°, following by hydration in distilled water. It was also necessary to neutralize the pH by several lavages at 24 hour period.

Grafts with 5.0 cm length and 5.0 mm internal diameter (I.D.) and approximately 500 µm wall thickness were manufactured (Figure 1). The process of manufacturing consisted in using a solid stainless steel rod with a diameter of 5 mm (that defines the graft internal diameter), an external silicone tube with the objective of define the external diameter of the graft and two O-rings that close both ends of the molds and kept the PVA/Dx solution in the molds. Finally the molds containing the former solution were stabilized in a metallic support and subjected to the physical reticulation and annealing processes as previously described. PVA/Dx grafts were sterilized by immersion in ethanol 90% for 5 minutes, after this period they were then thoroughly rinsed in sterile physiologic saline.

A 5 cm length ePTFE vascular graft (IMPRA® Carboflo®, C.R.Bard Inc., Murray Hill, New Jersey, USA) with a 5.0 mm I.D. and carbon inner lining was used as control graft. The average internodal distance (IND) for this graft is 60 micron.

2.2 MSCs culture and characterization before *in vivo* application

Human MSCs isolated from the WJ of UC were purchased from PromoCell GmbH (C-12971, lot-number: 8082606.7). The MSCs were cultured and maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. Mesenchymal Stem Cell Medium, PromoCell (C-28010) was replaced every 48 hours. At 80% confluence, cells were harvested with 0.25% trypsin with EDTA (GIBCO) and passed into a new flask for further expansion. MSCs at a concentration of 10⁴ cells/cm² were cultured exhibiting an 80% confluence after 4 days in culture medium. The phenotype of MSCs was assessed by PromoCell assay. Rigid quality control tests were performed for each lot of PromoCell MSCs and tested for cell morphology, adherence rate and viability. Furthermore, each cell lot was characterized by flow cytometry analysis for a comprehensive panel of markers, such as platelet endothelial cell adhesion molecule – 1 (PECAM-1, CD31), homing cell adhesion molecule (HCAM, CD44), CD45, and Endoglin (CD105). The MSCs exhibited a mesenchymal-like shape with a flat and polygonal morphology. During expansion the cells became long spindle-shaped and colonized the whole culturing surface and PVA membranes. The MSCs phenotype was confirmed by flow cytometry before *in vivo* testing. Detection was performed with the following antibodies and their respective isotypes (all from BioLegend unless stated otherwise): PE anti-human CD105 (eBioScience); APC anti-human CD73; PE anti-human CD90; PerCP/Cy5.5 anti-human CD45; FITC anti-human CD34; PerCP/Cy5.5 anti-human CD14; Pacific Blue anti-human CD19 and pacific-blue anti-human HLA-DR. Cytogenetic analysis

was carried out before *in vivo* application between passages 4 and 5. When 80% confluence was reached, culture medium was changed and supplemented with 4 µg/ml colcemid solution (stock solution, Cat. n°. 15212-012, Gibco, USA, New York). After 4 hours, cells were collected and suspended in 8 ml of 0.075M KCl solution supplemented with bovine fetal serum. Then the suspension was incubated in 37°C for 35 minutes. After centrifugation (1500 rpm), 8 ml of the fixative methanol: glacial acetic acid at 6:1 was added and mixed together, and the cells were again centrifuged. After two rounds of fixation, two new rounds were performed with the fixative methanol: glacial acetic acid at 3:1. After the last centrifugation, the cell suspension was spread onto very well cleaned slides. Chromosome analysis was performed by one scorer on 20 Giemsa-stained metaphases. Each cell was scored for chromosome number. Routine chromosome G-banding analysis was also carried out for determination of the karyotype. The karyotype of the MSCs was determined and no structural alterations were found demonstrating absence of neoplastic characteristics in these cells, as well as chromosomal stability to the cell culture procedures. Intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was measured in Fura-2-loaded MSCs cells by using dual wavelength spectrofluorometry as previously described³¹. Results obtained from epifluorescence technique are referred to measurements from MSCs which correspond to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from cells that did not begin the apoptosis process (data not shown). Afterwards, a MSCs suspension was prepared in 5 ml syringes, each containing MSC at a concentration of $10^6/\text{ml}$ for posterior intra-operatively peri-implant injection.

Reverse transcriptase Polymerase chain reaction (RT-PCR) and qPCR targeting specific genes expressed by the MSCs *in vivo* applied was performed to certify that the MSCs used *in vivo* were not differentiated. For that, primers were designed targeting seven human genes based on the literature³²⁻³⁴. DNA sequences from GAP-43, NF-H, Nestin, GAPDH, β -actin, NeuN and GFAP genes from mice (*Mus musculus*), rat (*Rattus norvegicus*) and human (*Homo sapiens*) were downloaded from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) and aligned using the Clustal Omega bioinformatic tool from EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). MSCs culture was harvested with 0.25% trypsin EDTA solution (Gibco) and centrifuged at 2000 rpm 4 °C during 5 min. Cell pellets were used for total RNA extraction using an adequate extraction kit, High Pure RNA Isolation kit (Roche). Briefly, cell pellets were lysed with a lysis buffer, loaded into a High Pure Filter Tube, DNA was removed with DNase I enzyme, washed twice on column, and eluted with 100 µl of Elution Buffer. RNA was quantified and its quality assessed by using a Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer and reads from 220 nm to 350 nm, and then stored at -80 °C until further use. In the following step, cDNA was synthesized from the purified RNA. To fulfill that issue, the kit Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE

Healthcare) was used following the manufacturer instructions. Briefly, 1.5 µg of total RNA was used and diluted in DEPC-treated water to a 30 µl final volume in a RNase-free microcentrifuge tube; then heated at 65 °C for 10 minutes and then chilled in ice; transfer the RNA solution to the kit tube containing the first-strand reaction mix beads; add 0.2 µg of Oligo(dT) primer and DEPC-treated water to a 33 µl final volume; mix the content and incubate at 37 °C for 60 minutes. cDNA was synthesized and stored at -20 °C until further use. Of referring that, due to the use of the Oligo(dT) primer, the synthesized cDNA corresponds to the mRNA present in the sample at the time of collection. cDNA synthesized from undifferentiated MSCs was used to check the expression of seven genes, two housekeeping genes (β-actin and GAPDH) and five specific of neuronal cells (GFAP, NeuN, Nestin, NF-H and GAP-43). Primers were designed in house and then synthesized in an external laboratory (MWG Operon, Germany). Upon arrival, primers were rehydrated in DNase/RNase free water in a concentration of 100 pmol/µl. Quantitative PCR (qPCR) was performed in a iCycler® iQ5TM (BioRad) apparatus using the iQTM SYBR® Green Supermix (BioRad). Each pair of primers targeting a gene was used to analyze its expression in the differentiated and undifferentiated HMSC's cDNA, in triplicate, along with a negative control. The plates containing the mix targeting the seven genes for both types of cells were submitted to the following cycles of temperatures: 95°C during 4 minutes, 35 cycles comprising 95°C during 20 seconds, 55°C during 20 seconds and 72 °C during 20 seconds ending with Real-Time acquisition, and final extension of 75°C for 7 minutes. After cycling temperatures, the number of cycle threshold for each well was recorded. The plate containing the amplified genes or qPCR products was kept in ice and observed in a 2% agarose gel to check and reinforce the identity of the amplicons. Briefly, 2 gr of NuSieve® 3:1 Agarose (Lonza) were mixed with 100 ml Tris-Acetate-EDTA buffer, melted, mixed with ethidium bromide in a final concentration of 0.2 µg/ml, and loaded in a horizontal electrophoresis apparatus. After solidification, 15 µl of the qPCR products were loaded in the agarose wells, and submitted to a 120 V potential difference during 40 minutes to separate the amplicons. Gel was then observed under UV light and pictures recorded using the GelDoc® 2000 (BioRad) and Quantity One® software (BioRad). In these cells, the molecular analysis showed a very small amplification of GFAP gene, absence of amplification of the NF-H and GAP-43 genes, and reasonable amplification of NeuN, β-actin, GAPDH and Nestin genes. Amplification of a given gene is correlated with its expression seeing that the template DNA is the one generated from mRNA³⁵. The RT-PCR results confirmed that the MSCs used in vivo were not differentiated.

2.3 Animal study design

Twenty four adult sheep with a body weight of about 60 Kg were used for this experimental study (Table 1). Eighteen animals were allocated to the PVA/Dx grafts implantation groups, being one group of those animals associated to MSCs perivascular injection. Six of those animals also received an anticoagulation protocol based on the association of clopidogrel (150 mg/day), heparin (150 IU/Kg/day) and warfarin (0.6 mg/Kg/day)³⁶. Additionally, one group of sheep was implanted with PVA/Dx grafts without MSCs and anticoagulation protocol. Finally, ePTFE grafts were also implanted in 6 animals as a control group. All the *in vivo* experimental groups followed adequate measures to minimize pain and discomfort taking in account human endpoints for animal suffering and distress. All procedures were performed with the approval of the veterinary authorities of Portugal (Direcção Geral de Veterinária) in accordance with the European Communities Council Directive 86/609/EEC.

2.4 Graft implantation

The animals were solid fastened for 48 hours prior to the surgical procedure. An intravenous catheter of 20G was placed at the cephalic vein. The anesthetic protocol consisted in xylazine (0.2 mg/Kg, intravenous) as tranquilizer. For inducing anesthesia, sodium thiopental was used at a dose of 15 mg/Kg intravenous. The anesthetic maintenance was done with isoflurane at 2% via endotracheal intubation carried by 100% oxygen with a flow of 2l/min.

For surgery, sheep were placed in right lateral recumbence over a tilted table so that the animal's head and neck was always lower than the stomach to reduce risks of aspiration pneumonia. The wool was clipped in a roughly square area in the left cervical region. The skin was aseptically prepared with an iodopovidone solution. An incision of approximately 10 cm was made in the left cervical region to expose the left common carotid artery. The size of the carotid artery was approximately 5 mm ID previously measured by ultrasound. After heparinization (100 IU/Kg), bulldog clamps were placed cranial and caudal in the carotid artery and a 5 cm segment was resected. The implant suture technique was proximal and distal end-to-end anastomosis through an everting technique with polypropylene 6/0 USP (Figure 2). The same procedure was used for ePTFE grafts (IMPRA®Carboflo®). In the experimental groups allocated to stem cell association, 5 ml of MSCs suspension (10^6 /ml) were injected in tissues located at peri-anastomotic sites. The muscular layer was sutured with polyglyconate (Monosyn®, Bbraun) and the skin was sutured with silk (Silkam®, Bbraun). Penicilin G procainic plus dihidrostreptomycin and flunixin meglumine 2 ml/45 Kg was given as antibiotic and

analgesic therapy respectively for three days. The animal's general health condition was checked daily.

2.5 Examination of graft patency and dimensions

2.5.1 Blood flow assessment by audio-doppler

Immediately after surgery graft patency was assessed by flow detection at the graft level by using an audio Doppler (Vetex® duo, Huntleigh diagnostics) equipped with a pencil probe of 8 MHz. Further patency checking was done by Doppler mode ultrasound.

2.5.2 Eco-color Doppler protocol

Graft patency was checked in the day after implantation by a post-operative control and once monthly thereafter for 6 months. All echo evaluations were made with the echo machine Philips HDI 1500 equipped with a linear L 12-5 probe or the Philips CX 50 machine equipped with a linear L 12-3 probe. Measurements were made at baseline, at a maximum of 48 hours post-surgery and there after monthly until graft explantation, according to the study calendar (Table 1). Both left and right carotid arteries were always evaluated. The probe marker was placed in the direction of flow in the study arteries facing cranially. After surgery the left carotid artery had three evaluation sites, namely the pre graft, graft and post graft named according to the flow direction. B mode ultrasound consisted of diameter measurement, thrombus formation, collateral vessel formation and graft appearance with time. Color flow Doppler permitted evaluation of graft patency and localization of flow obstruction/stenosis for posterior power wave (PW) Doppler analysis. Pulsed wave Doppler measurements were made with a 60° angle correction, to overcome the need for parallel scanning to the flow under evaluation for optimal PW spectral Doppler tracing. PW Doppler permitted the evaluation of laminar versus turbulent flow if the spectrum exhibited spectral broadening; maximum systolic velocity; maximum diastolic velocities and the resistive index were measured.

2.6 Graft explantation

The grafts in the three experimental groups were explanted at several time points. The study calendar is shown in Table 1. The animals were sacrificed after heparinization, by lethal injection of barbiturate and the grafts with approximately 2-3 cm adjacent segments of carotid artery were collected. Patency of the harvest was also assessed by perfusion with physiologic saline. Grafts were then transversally sectioned in five portions (cranial carotid, transition cranial carotid – graft, graft, transition graft-caudal carotid, caudal carotid). All explanted grafts

1
2
3 were macroscopically examined for aneurism formation, thrombosis, adhesions to more deep
4 tissue layers. Specimens were identified and fixed in 10% buffered formalin solution for
5 histological analysis and for scanning electronic microscopy (SEM).
6
7

8 9 2.7 Scanning electronic microscopy (SEM)

10
11 After explantation the mid-section of the graft were separated and fixed in 2%
12 paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde solution for a minimal period of 2 hours.
13 Afterwards the samples were dehydrated in a graded series of ethanol. Subsequently the
14 samples were critical point dried and coated with an Au/Pd thin film, by sputtering, using the
15 SPI Module Sputter Coater equipment. The SEM exam was performed using a High resolution
16 (Schottky) Environmental Scanning Electron Microscope with X-Ray Microanalysis and Electron
17 Backscattered Diffraction analysis: Quanta 400 FEG ESEM / EDAX Genesis X4M in high vacuum
18 mode. Each image contains a databar with the most important analysis conditions. Signs of
19 endothelialization and any signs of material degradation were analyzed.
20
21

22 23 2.8 Histopathological analysis

24
25 Samples of vascular explants were fixed in 10% buffered formalin and paraffin-embedded.
26 Sections 3 μm thick were made, one being stained with haematoxylin and eosin (H&E) for
27 histopathology, other was used for the histochemical study with Modified Masson's Trichrome
28 and the remainings were submitted to an immunohistochemical panel. The microscopical
29 slides were observed using a Nikon microscope (Nikon Eclipse E600) equipped with x 2, x 4, x
30 10 and x 40 objectives and coupled with a photo camera (Nikon Digital Sight DS-5M) equipped
31 with a lens (Nikon PLAN UW 2X/0.06). Several aspects of local tissue tolerance were verified
32 concerning the presence of fibrous tissue, fibrin, degenerative phenomena, necrosis, neo-
33 vessels, mineral precipitates/tissue calcification, foreign body cells, biomaterial degradation
34 and the presence of endothelial like-cells at artery and graft lumen. A more objective
35 evaluation of histological samples was made by: (1) measurement of fibrous tissue layer that
36 covers externally the prosthesis; (2) the development of intimal hyperplasia at prosthesis –
37 carotid artery junction; (3) presence of thrombus. Morphometric measurements were
38 performed by image analysis software (ImageJ, National Institute of Health, USA). For fibrous
39 capsule thickness measurement the color deconvolution method was used to isolate collagen
40 stained blue fibers from smooth muscle red stained cells. The mentioned fibers were digitally
41 separated using ImageJ software (version 1.46c; WS Rasband, National Institutes of Health,
42 Bethesda, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and an ImageJ plugin for color deconvolution, which
43 calculated the contribution of aniline blue and red stained fibers, based on stain-specific red-
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

green-blue (RGB) absorption^{37, 38}. Following deconvolution, scale was set to the 1000 micron scale bar on each image and measurements in three different locations were made.

2.9 Immunohistochemical analysis

Three different regions of the explanted specimens, namely graft, carotid artery sections immediately caudal and caudal to the graft were selected and incubated with three primary antibodies. Specifically, CD31 antibody was used in order to evidence endothelial cells in luminal surfaces of grafts. The other two antibodies were directly used against alpha-actin of smooth cell muscle and the receptors CD14 of macrophage with the objective of evaluate tissue ingrowth in graft wall and inflammatory reaction in graft surrounding tissue. Sections were deparaffinised, hydrated and antigen retrieval was performed in a pressure cooker in 10 mmol/L sodium citrate buffer, pH 6.0, for 2 minutes (min). Slides were cooled for 10 min at room temperature and rinsed twice in triphosphate buffered saline (TBS) for 5 min. Specifically for CD 31 immunostaining, the antigen retrieval was made by enzymatic digestion using a solution of pepsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at 0.4% (w/v) in dionized water in which 1 ml of cloridric acid (1N) was added per 100 ml of former solution. The slides were immersed in the previous prepared solution and incubated at 37°C for 30 min. At the end of the incubation period, the slides were placed in the freezer at - 20°C immersed in a TBS solution to stop the enzymatic reaction.

The Novolink™ Max-Polymer detection system (Novocastra) was used for visualization,, according to the manufacturer's instructions. After blocking endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min, sections were incubated overnight at 4°C, with the following monoclonal antisera: mouse anti-human muscle alpha-actin (SMA; clone HHF 35, DAKO corporation, Carpinteria, California, USA) diluted 1:300; mouse anti-sheep CD31 (clone CO-3E1D4, AbD Serotec, Kidlington, UK) diluted 1:25 and mouse anti-bovine CD14 (clone CAM36A, Kingfisher Biotech, St. Paul, Minnesota) diluted to 1:150. Sections were rinsed twice with TBS between each step of the procedure. Color was developed for up to 7 min at room temperature with 3,3'-diamino-benzidine (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and sections were then lightly counterstained with haematoxylin, dehydrated and mounted.

2.10 Digital Image Analysis

IHC digital images were used for developing a semi-automated analysis protocol. Each slide was focused and the white balance was made in the camera software before the acquisition of the image. Images of caudal and cranial artery transitions to prosthesis, and graft sections with 100x amplification were analyzed. As a first step, we used a color de-convolution technique to

un-mix the pure DAB, hematoxylin stained areas leaving a complimentary image. For quantification of cells marked with CD14 or CD31, the region of interest (ROI) were predefined in ImageJ software with the following dimensions 800 pixels of width/300 pixels of height. 3 mini-images were obtained in those pre-settings per each slice analyzed. For cell counting, the plugin cell counter of ImageJ software was used. The software performed counting at every click of the observer on each stained cell. At the end of the analysis, software had the final score for each analyzed image.

To alpha-actin staining analysis the color deconvolution method was used to isolate alpha-actin positive DAB-stained cells from alpha-actin negative hematoxylin stained cells. DAB and hematoxylin were digitally separated using ImageJ software (version 1.46c; WS Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and an ImageJ plugin for color deconvolution, which calculated the contribution of DAB and hematoxylin, based on stain-specific red-green-blue (RGB) absorption^{37, 38, 38}. Following deconvolution, scale was set to the 1000 micron scale bar on each image. The deconvoluted image was subjected to histogram analysis, with the lower threshold set at 10, and the upper threshold set at 100. For each image, three fields of consistent staining were selected and measured using 200×200 pixel boxes. A value was assigned to each field using ImageJ software, and the average value of all three fields was used to assign a staining value (arbitrary units) to each image.

2.11 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS version 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Results are presented as mean ± SD. Multiple comparisons between groups were performed by one-way ANOVA supplemented with Turkey's HSD post hoc test. For comparisons between two groups, the nonparametric Mann-Whitney U test was used. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Graft patency and blood flow evaluation

All animals were subject to previous B-mode ultrasound color flow Doppler. None of the used animals exhibited common carotid artery pathology or abnormal flow. Immediately, after implantation all grafts were assessed to flow at graft level and also for hemorrhage at anastomosis sites. Only at control group, 2 animals showed no flow signs which suggest a prostheses obstruction probably due to an acute thrombus formation at the anastomotic sites

(Figure 3). None of the implanted animals exhibited hemorrhage or graft rupture during the experimental period concerning the bleeding assessment. The patency rate decreased from 100% to 87.5% and 83.3% in group 1 and 3 respectively 24 hours post-surgical procedure, (Table 2). Again, mode B ultrasound and color flow Doppler showed that the decrease in patency rate was related to obstructions at graft-artery interface most probably by thrombus formation. Even so, there was a good concordance correlation of graft patency rate immediately after surgery and at 24 hours post-surgical procedure in the 4 experimental groups. In week 4, a marked decrease in the patency was observed in all experimental groups. However, a higher patency rate was observed in the PVA/Dx associated to MSCs experimental groups (42.85 and 33.33 %, group 2 and group 3, respectively, Table 2). On the other hand, the lowest value for patency rate (12.5%) at week 4 was detected in group 1. After week 4, there was a continuous decrease in the patency rate in group 1 and group 2, reaching a zero value at week 8 and week 16 respectively. PVA/Dx with MSCs and the control group patency rate remain in higher levels till the end of the experimental group. At latter experimental time points (week 8 forward), the obstructed flow observed was due to intimal hyperplasia (Figure 4).

Several parameters were used to evaluate the blood flow characteristics through the vascular prosthesis. Resistive (RI) evaluated, was a parameter that assessed the resistance of blood flow through vascular bed and indirectly evaluated the stenosis of the artery lumen. In the four experimental groups, the RI values ranged between 0.34 ± 0.08 at week 16 (Graphic 1-B) and 0.63 ± 0.07 in week 12 week in group 3 and 2, respectively. Although, the obtained values for RI showed statistically significant differences between groups ($p < 0.05$) at week 4 and week 12 at graft location. Also at the pregraft and postgraft locations the IR value was statistically significant different ($p < 0.05$) for week 12. The higher values for RI were registered inside the graft rather than at artery-graft transitions in the several experimental groups (Graphic 1-B). The ID of implanted PVA/Dx grafts remained roughly constant during the experimental period of 24 weeks (Graphic 1 -A). In the control group (ePTFE), it was evidenced a decrease in ID when compared to the initial ID of the implanted graft (Graphic 1 – A). At pre- and post-graft ID of the arteries, a tendency in the decrease was noticed from initial implantation moment until the correspondent explantation time. The values of ID for control graft were statistically significant different ($p < 0.05$) in almost of the experimental time points in graft, pre-graft and post-graft locations (Graphic 1- A). This fact was not observed in group 3 (PVA/Dx/MSCs) and group 4 (ePTFE) in the post-graft location. Regarding peak systolic and diastolic blood flow velocities that were measured in three different locations; the higher velocities (1.45 ± 0 m/s)

for systolic blood flow were observed inside the graft from 12 weeks onwards (Graphic 1 – D). Diastolic blood flow velocities ranged from 0.16 ± 0.05 m/s to 0.73 ± 0.19 m/s. For this parameter, higher values were observed in ePTFE grafts, on the three sites of measurement. Statistical significant differences ($p < 0.05$) were observed in pre-graft (week 4 to week 12), graft (week 4 to week 16) and post-graft (week 4 and week 8) locations (Graphic 1 – C). Inside the graft, a typical laminar blood flow was evidenced through the experimental period. However, one exception was verified at week 20 and week 24 in group 3; where a turbulent flow was noticed precluding the measurement of blood flow velocity. Finally, it was observed an event of spontaneous recanalization of a previously obstructed graft confirmed by Doppler mode ultrasound. This finding was observed in group 3 (PVA/Dx/MSCs) in one animal between week 4 and week 8.

3.2 Gross observations at implantation and explantation

For the surgical implantation procedure, it was observed that the PVA/Dx grafts were easy to cut, elastic and also easy to suture like it was observed for the ePTFE grafts. After completion of anastomosis, re-establishment of blood flow was macroscopically observed and also perceptible to palpation. One common problem observed at suture site was the needle hole's bleeding easily controlled with local gauze pressure. On the contrary, ePTFE grafts needle hole's bleeding was more severe forcing in most of the procedures the use of tissue seal n-Butyl-2 Cyanoacrylate at needle puncture sites. After the animal's euthanasia, the grafts were explanted and local intolerance signs were registered. It was observed adhesions between the graft and the underlying muscle layers only in two animals of the group 1 (PVA/Dx). Signs of seroma, local infection and necrosis or aneurysm formation were not observed in any of the experimental groups. Following *ex vivo* perfusion of the grafts, it was demonstrated that the obstructed grafts presented resistance to physiologic saline flushing. In this experimental study, 66% (4/6) of PVA/Dx plus MSCs collected grafts were obstructed at time of collection with thrombus (Figure 5) or intimal hyperplasia. Without MSCs local infiltration, the percentage of obstructed grafts rises to 83.3% in the moment of retrieval. On the other hand, ePTFE grafts presented only 33.3% of obstructed grafts at the time of collection (Table 3).

3.3 SEM

SEM analysis was performed in six explanted PVA/Dx grafts and in one not implanted PVA/Dx graft. In patent grafts (24 weeks post-implantation), a confluent endothelial cells layer with a typical cobblestone appearance was observed near the graft-artery anastomosis (Figure 6). In more central areas the endothelial cells were disposed in a patchy pattern. The endothelial

cells appeared firmly attached to a neointima layer that consisted in structures with an appearance of collagen bundles and fibroblasts. In obstructed grafts, the luminal surface of this grafts were filled with a fibrin network with erythrocytes and platelets imprisoned. The thrombus that led to obstruction of the lumen of the graft remained non adherent and loosened during the sample processing. The SEM analysis of the outer surface confirmed the observations made by the histopathological analysis. The outer surface was surrounded by fibrous capsule of variable thickness. Additionally, no signs of cellular infiltration or tissue ingrowth were observed in cross section SEM analysis of graft wall. The SEM analysis of a PVA/Dx non-implanted graft, showed a porous structure of the wall. Pores had a mean diameter of $8.15 \pm 5.50 \mu\text{m}$ (range $1\text{--}22 \mu\text{m}$) and the mean thickness of graft wall was $684.19 \pm 79.54 \mu\text{m}$.

3.4 Histological analysis

The main histological observations for the four experimental groups are summarized in Table 3. The several types of grafts exhibited a low grade inflammatory reaction at the peri-graft surface. This inflammatory reaction was mainly composed of giant cells and activated macrophages associated to variable grade of fibrosis, suggesting a foreign body reaction. Additionally, no signs of infection were observed (e.g. phagocytized bacteria and purulent infiltration). The calcification of grafts wall and/or peri-graft artery wall was registered. Those findings were only observed at the caudal artery wall – graft transition of one explanted graft at week 16 in group 3. These data suggested a very low prevalence ($1/36\text{--}2.7\%$) of calcification in group 3 and also in the other experimental groups. The luminal surface was observed for endothelialization, intimal hyperplasia and thrombus formation. Endothelial cells were only detected at graft-artery transitions but not at mid-sections, at 12 and 16 weeks in PVA/Dx/MSCs groups. In the reference material (ePTFE) endothelialization was observed at same locations when compared to the former groups. No endothelial cells were observed in explanted grafts of group 1. Two types the thrombus were identified; Non-organized thrombus, that consisted mainly in a fibrin mesh imprisoning erythrocyte were related to a recent event of thrombosis. As suggested this newly formed thrombus is related to a recent thrombotic event. In the opposite side, organized thrombus (Figure 7) was characterized by the presence of fibrous tissue, fibroblasts and neo-vessels at the center of the thrombus and was related to a longstanding thrombotic event.

At the peri-graft surface, a fibrous capsule of different thickness was observed among all experimental groups. The group that presented the largest value for fibrous capsule was group

1 (PVA/Dx) with a value of $393.61 \pm 188.81 \mu\text{m}$ (Table 3). The lowest values for fibrous capsule thickness were registered on group 2 ($200.97 \pm 91.87 \mu\text{m}$) and group 4 ($228.13 \mu\text{m} \pm 129.77$). A statistical significant difference ($p > 0.05$) was verified between groups that associated PVA/DX with MSCs group and PVA/Dx group. Additionally, the cellular infiltration at peri-graft interface was composed mainly of macrophage and giant cell with exception of ePTFE at week 4, where an extensive pyogranulomatous inflammation was detected.

Modified Masson's Trichrome allowed measuring the fibrous capsule also in other locations besides the graft site. At caudal and cranial artery transitions to graft, the fibrous layer was thinner than in the mid-graft section. That finding was verified in 3 experimental groups. However, there was one exception. In caudal artery transition to graft at ePTFE group, the fibrous layer at this location ($248.59 \pm 112.94 \mu\text{m}$) was thicker than in mid-section of graft ($228.13 \pm 129.77 \mu\text{m}$) in spite of the inexistence of significant statistical difference ($p > 0.05$). In the pre- and post-graft sites, the lower measurements for fibrous layer ($160.37 \pm 57.44 \mu\text{m}$ and $218.76 \pm 52.52 \mu\text{m}$ respectively) were detected in PVA/Dx associated to MSCs group (group 3). Other evidence highlighted by the results of fibrous layer measurements were the more elevated values observed after 12 weeks of implantation in the three experimental groups (PVA/Dx/MSCs, PVA/Dx and ePTFE), (Table 5). The statistically analysis demonstrated that the PVA/Dx/MSCs group values for fibrous layer measurements were significantly lower ($p < 0.05$) lower at different locations and time points (Table 5) when compared to the other 2 groups (ePTFE and PVA/Dx). Evidences of material biodegradation were detected only in group 3 at the longest experimental time points (20 and 24 weeks). However, the observed aspects of biodegradation were more related to physical fragmentation of PVA/Dx grafts than with enzymatic biodegradation, due to the inexistence of enzymes in animals capable to degrade this biomaterial.

3.5 Immunohistochemical analysis

The results from image analysis of tissue sections subjected to immunohistochemical analysis are displayed on Table 4. Concerning the CD31 antibody, only in group 3 stained cells was observed at caudal artery-graft transition and at graft luminal surface in 2 samples from 2 different animals. The cells, more specifically macrophage that have captured CD14 antibody were quantified in the surrounding tissues of implanted grafts and cranial/caudal artery transitions. Our results showed that macrophages number detected in tissue sections were more prevalent in PVA/Dx group (group1), exhibiting the highest value for the estimated parameter (29.22 ± 14.93) at week 8 of explantation. The statistical analysis (Table 4) exhibited

several significant differences ($p < 0.05$) for CD14 parameter during the experimental period, namely at pre-graft (week 4, week 8 and week 12), graft (week 4, week 20 and week 24) and post-graft (week 8 and week 24) locations. The registered differences were mostly verified between group 3 (PVA/Dx/MSCs) and group 1(PVA/Dx). Also in ePTFE group, the CD14 cell stained counting was considered statistically inferior in week 4 (graft) and week 8 (post-graft) to the other groups. The lowest value (1.33 ± 2.30) for this parameter was observed in PVA/Dx/MSCs group (group 3) at 24 weeks post-implantation. However, the lowest mean global value (which reflects the CD14 staining in the 24 week period) for this parameter was registered in the ePTFE group (5.36 ± 2.59) as opposed to PVA/Dx group result (8.83 ± 10.83). The mean values obtained from the ePTFE group (group 4), PVA/Dx (group 1), PVA/Dx/MSCs (group 3) (6.97 ± 4.38) presented no statistically significant differences ($p < 0.05$). Analyzing the CD14 staining values obtained in all experimental groups during the studied healing period, it was observed a common tendency, the higher values were observed in the early implantation periods as opposed to the lower values registered in latter experimental times.

Smooth muscle staining was quantified in tissue slides from 3 different locations (graft, cranial and caudal artery transition). In all observations, higher values were obtained in the cranial and caudal artery transitions to graft (Table 4). As expected, lower values for alpha-actin staining were obtained in the graft section. Additionally, for the same animal studied sections higher values for alpha-actin staining in cranial artery transition-graft were noticed compared to other studied sections (graft and caudal artery-graft transitions).

4. Discussion

In recent years considerable research efforts have been directed at developing more suitable vascular grafts, despite these efforts the main problem of vascular grafts is still unresolved; in humans, grafts remain largely without an endothelium, even after years of implantation³⁹. The main objective of this experimental work was to produce a SDGV combining a hydrogel (PVA) with a polysaccharide (dextran) suitable to pre-clinical studies in a large animal model, the ovine animal model. The structural and functional performance of PVA/Dx grafts was assessed in a long term study in order to address the mentioned obstacles. Tiwari et al. stated that tissue ingrowth and surface elasticity close to that of the host tissue and minimized thrombogenicity may be prerequisites for a successful synthetic SDVG⁴⁰. Therefore, it appears that graft structural porosity associated with the intrinsic viscoelastic properties similar to native arteries are very important features to consider for manufacturing SDVGs. In this study, the primary patency rate in PVA/Dx grafts was inferior to that registered

in ePTFE group. Although, when associated to MSCs the patency raised to values similar to the reference biomaterial. Endothelialization of graft luminal surface is the main factor that contributes for low thrombogenicity and by consequence for increasing patency rates at long term. The use of human MSCs from Wharton's jelly umbilical cord to generate endothelial cells in tissue-engineered blood vessels is a current trend of vascular research^{41,42}. However, our objective with the peri-graft injection of MSCs was to stimulate the trans-mural tissue ingrowth mediated endothelialization and to modulate the inflammatory response observed after the surgical procedure in order to improve the vascular regeneration and the graft biointegration. In spite of the improvement of patency rate in group 3, no tissue ingrowth was detected in explanted grafts from group 3 and the endothelial cells detected by SEM at week 24 post-implantation should be attributed to trans-anatomic endothelialization (TAE). TAE is a common finding in the sheep particularly in juvenile models rather than in senescence models^{43,44}. In our case, it was used a senescence model (age 5 years) that even so allowed endothelialization of luminal surfaces in PVA/Dx grafts. The use of anticoagulation protocol, similar to that used for humans subjected to vascular bypass procedures did not result in an improvement of the patency rate ($43.02 \pm 41.80\%$) in group 2. This fact was surprisingly due to well proven high bioavailability of warfarin in ruminants administered by the oral route^{36,45}. It is our believe, that the large volume and other intrinsic factors of the rumen can make more unpredictable the effects of oral given anticoagulants^{46,47}. The ePTFE implants used in our study, had the luminal surface carbon impregnated which decreases platelet adhesion and fibrin deposition when compared to standard ePTFE⁴⁸. This special feature can be responsible for the higher than expected patency rate ($84.28 \pm 24.66\%$) in this group. The ID values (Graphic) of the PVA/Dx based grafts remained constant in relation to initial produced diameter (5 mm), suggesting that graft remain structurally stable during the healing period of 24 weeks. As opposed, the ePTFE graft showed a decrease in the ID specifically after 8 week experimental time point. These results suggested a higher resistance to compressive and kinking forces in PVA/Dx grafts when compared to ePTFE⁴⁹. Concerning the flow characteristics, the RI according to Pourcelot are a hemodynamic parameter that is easily determined by Doppler sonography and basically reflects the vascular resistance⁵⁰. In the renal and carotid arteries, the RI has been studied thoroughly as a surrogate marker of atherosclerotic alterations and intima-media thickness respectively^{51,52}. Higher resistive index were observed in group 2, the registered values in the large majority of the time points were over 0.60 (Graphic). In the context of our experimental work, the increased values to IR can be related to vessel and/or graft stenosis due to intimal hyperplasia or thrombus formation. The analysis of blood flow velocities evidenced higher systolic peak velocities (SPV) in group 4 at the three sites of

measuring. The acceleration of blood flow in ePTFE implanted grafts can be related to the higher mismatch for ID values between graft and anastomosed arteries. The ID of ePTFE grafts consistently presented values inferior to 4 mm whereas cross-section of hosted arteries exhibited lower values subjecting blood flow to acceleration⁵³. Other feature implicated in flow acceleration is compliance mismatch which is of particular importance in SDGV (< 6mm) in grafts made of stiff polymers as ePTFE and PET. The viscoelastic properties of native arteries characterized by the young modulus test ranged between 1.2×10^5 and 1.3×10^5 Pa, values that were similar to young modulus results attributed to PVA/Dx grafts ($9.8 \times 10^4 \pm 4.8 \times 10^3$)^{22, 54}. In the PVA/Dx implanted grafts the registered values for SPV were lower when compared to ePTFE grafts. As previously suggested, the more similar viscoelastic properties to native arteries of PVA/Dx grafts can be responsible for that observation. As expected, the diastolic peak velocities followed the same tendencies of SPV values. The turbulent flow observed at week 20 and week 24 in group 3 cannot be related to luminal stenosis since the ID of graft and hosted segmented arteries remain stable and matched⁵³. This event of disturbed flow resulted from high and low shear stresses related to compliance mismatch at graft host artery interface.

The *in situ* structural performance of PVA/Dx grafts followed the previous published results^{54,55}. During the experimental period of 24 weeks no rupture of the PVA/Dx grafts was noticed reinforcing the capacity of these grafts to support arterial pressure. The *In vitro* mechanical properties of PVA/Dx evidenced that these grafts can support until 3.8 ± 0.3 bar which is under the range supported by host arteries (2.7 and 5.6 bar)^{22, 54}. An unusual event of spontaneous recanalization of previously obstructed graft was detected in group 3 (PVA/Dx/MSCs) in one animal between week 4 and 8. That event was rarely reported in humans with occlusive arterial diseases and resulted from spontaneous recanalization rather from augmented collateral circulation which is more common⁵⁶. In our case by the SEM and Doppler mode ultrasound analysis it was concluded that the revascularization resulted from recanalization. The underlying process of spontaneous recanalization remains unknown, although fibrinolysis probably plays an important role. It should also be considered the MSCs capacity for angiogenesis by local secretion of several growth factors and cytokines³⁵, which might be important for these results. Stimulation of the fibrinolytic pathway via the conversion of plasminogen to plasmin is mediated by activators found in blood vessels and other body tissues and in small quantities in the circulating blood⁵⁷. Spontaneous clot lysis is thought to be the result of local or secondary fibrinolysis. Tissue damage, anoxia, and other factors associated with vascular occlusion result in release of extrinsic factors from blood vessel walls

and surrounding tissue⁵⁶. These split plasminogen to form plasmin, which in turn is active in clot lysis.

According to the SEM observations, there wasn't any evidenced of trans-mural tissue ingrowth. One of the main contributing factors to tissue/cells infiltration in grafts wall is the porosity or dimensions of interstitial graft spaces⁵⁸. Irrigation of graft wall is one off the most important dimensions of graft healing through tissue ingrowth³⁹. For that process to be successful space will be needed to vessels sprouting and still leave some space to accompanying connective tissue cells to infiltrate⁵⁹. In our work, the mean diameter of the pores was $8.15 \pm 5.50 \mu\text{m}$ (range 1-22 μm) which is insufficient to a capillary vessels (average diameter of 10 μm) and functional arterioles (average diameter $23.1 \pm 13.1 \mu\text{m}$) to sprout in to grafts interstices^{59 60}. Other cells like smooth muscle cells and macrophage that follow and stimulate trans-mural ingrowing of endothelial cells were not observed concluding that trans-mural endothelialization was not accomplished⁶¹. The endothelial cells (EC) observed in the luminal surface of PVA/Dx grafts at 24 weeks were attributed to the hydrophilicity of PVA. It is recognized that the adhesion and proliferation of different types of cells on polymeric materials depend largely on surface characteristics such as wettability (hydrophilicity / hydrophobicity or surface free energy), chemistry, charge, roughness, and rigidity⁶². Additionally, it can be said with certain that those EC came from trans-anatomic endothelialization.

Other aspects of structural performance were analyzed by histology and imunohistochemical testing. Histopathological findings at the graft-host artery transitions confirmed the observations at SEM. The endothelialization and the supporting neointima were restricted to the more cranial and caudal portion of PVA/Dx grafts and also at the ePTFE grafts as well. The incomplete endothelialization of the PVA/Dx grafts, exhibited also on ePTFE grafts could be explained by the difficulties encountered by the capillaries present in the peri-graft tissue in penetrating and degrading the dense structure of the grafts. As similar behaviour was observed by Izhar et al. with a type of degradable SDVG implanted in the common carotid artery of dogs, they attributed the absence of endothelial cells and capillary ingrowth to the relatively low porosity of the graft and rather than by other⁶³. Other aspect to consider in the incomplete endothelialization was the shorter period of experimentation when compared to Solani et al. This work used sheep with implanted grafts during a 24 month period rather than 6 month to achieve a complete endothelialization⁶⁴. In the PVA/Dx graft group that didn't received MSCs the lack of endothelialization can be attributed to a precocious lower patency rate (4 weeks onwards was 0%) that precludes endothelial cells to adhere to surfaces.

Calcification was observed only in the caudal artery-graft interface in group 3 (Table 3). According to Flameng et al, calcification is a common finding in cardiovascular prosthesis recovered from juvenile sheep (less than 5 months of age)⁶⁵. In our study, adult sheep (5 years of age) were used which explain the low prevalence of calcification in explanted tissues.

During our histopathological analysis no signs of PVA/Dx biodegradation were registered. Only very mild physical fragmentation was observed in the outer surface of one graft that we attributed to friction between the graft and surrounding tissue layers. Although, the biodegradation process of PVA/Dx so far described, is a microbial mediated process which precludes their degradation by animal cellular enzymatic apparatus⁶⁶.

The fibrous layer that encapsulates the graft is considered the end-stage of foreign body reaction (FBR) and consists in walling off the implant by a vascular and collagenous fibrous capsule that is typically 50–200 μm in thickness⁶⁷. The observed levels of fibrosis were indirectly related to a lesser degree of macrophage activation induced by PVA. The measured level of fibrosis in our experimental period was higher and statistically significant different ($p < 0.05$) in PVA/Dx grafts (Table 5) when compared to the other groups. These statistical significant differences were more evident at the graft region at week 4, week 12 and week 20. Which suggests that when MSCs are injected at the peri-graft interface, fibrosis is decreased. That fact can be explained by the immunosuppression action of MSCs on macrophage, decreasing the synthesis of growth factors which are responsible for the growth of fibroblasts (expressed histologically as fibrosis)⁶⁸. Growth factors and cytokines (including platelet-derived growth factor-PDGF and tumor growth factor-TGF- β) known to be released by activated macrophages at the onset of the foreign body response are potent mitogenics for myofibroblasts progenitors^{69, 70, 71}. The pre and post graft sites as expected presented a lower fibrosis degree (Table 5) when compared to the graft site due to the absence or lower presence of the biomaterial on those sites thereby reducing FBR and associated fibrosis.

The EC marker, CD31 was evidenced poorly in grafts previously observed with EC by SEM or light microscopy. Only, in one graft site (Figure 8) at week 8 time point from group 3 (PVA/Dx/MSCs group), the EC were marked. Such a result is explained by the poor reaction of formalin-fixed and paraffin-embedded sheep tissue to CD31 monoclonal antibodies⁷². Quantification of macrophage was accomplished by the reaction of those cells with CD14. As expected, the number of marked cells increased from 4 weeks achieving a peak between week 8 and 16 week in PVA/Dx groups (Table 4). At latter time points the macrophage counting decreased from week 16 onwards in PVA/Dx groups. At long terms, there was statistically

significant differences ($p < 0.05$) between the PVA/Dx and PTFE grafts. Macrophages are probably the most important cells in chronic inflammation and higher counts at graft tissue interface usually evidence higher antigenicity and lower biocompatibility⁷³. Macrophages are probably the most important cells in chronic inflammation and higher counts at graft tissue interface usually evidence higher antigenicity and lower biocompatibility³⁰. The alpha-actin antibody was used to detect smooth cell muscle in three different locations. As expected the sites where the marking was more intense located at the caudal and cranial artery host-graft transition. The marking observed for alpha-actin at graft location can be related to the myofibroblast (which also express alpha-actin) presence in the fibrous capsule that surrounds the graft⁷⁴.

5. Conclusions

In this study, it was developed a new vascular graft fabricated with a copolymer of PVA and Dx, with handling and compliance characteristics that make it suitable for use as SDVGs. The preliminary animal experimentation using the ovine animal model, although performed in a restricted group of animals, showed similar patency rates PVA/Dx grafts when associated to MSCs isolated from the Wharton's jelly of the umbilical cord in comparison with a standard ePTFE graft, and the ability to resist to arterial blood pressure of large artery in a large animal model. However, further studies will be necessary to optimize the scaffold structure, such as the fabrication of a more porous wall to accelerate the peri-graft trans-mural capillary ingrowth, and therefore the speed of luminal endothelialization and the reduction of the thickness of the internal capsule. Another aspect to be considered is the possibility of incorporating of therapeutic molecules to functionalize the luminal surface in order to reduce the formation of luminal thrombus and by consequence to improve the long term patency rate. Nevertheless, despite the need for further improvement in the graft structure, it was demonstrated that using a PVA/DX associated to MSCs, an acceptable inflammatory response was observed with absence of PVA/Dx biodegradation, suggesting that PVA/Dx grafts remain structurally stable. PVA/Dx can be an excellent candidate scaffold for *in vitro* and *in vivo* tissue engineering in mechanically challenging applications, such as SDVGs, especially when associated to MSCs from the umbilical cord Wharton's jelly. Others issues will need to be addressed, namely the speed of endothelialization that can be accelerated by the use integrin peptides in the luminal surface.

6. Acknowledgments

This research was supported by QREN I&DT Cluster in Development of Products for Regenerative Medicine and Cell Therapies – Projects Biomat & Cell QREN 2008/1372, co-financed by the European Community FEDER fund through ON2 - O Novo Norte – North Portugal Regional Operational Program 2007-2013, by project FCT – ENMED/0002/2010 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Ministério da Educação e da Ciência and EuroNanoMed JTC 2010 Program, and by the program COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade, Project Pest-OE/AGR/UI0211/2011. Nuno Alexandre (SFRH/BD/64838/2009) and Irina Amorim (SFRH/BD/76237/2011) acknowledge FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Ministério da Educação e da Ciência, Portugal, for financial support. The authors also wish to thank ZEA – Sociedade Unipessoal, Lda, for the help in handling the animals during the experimental periods.

7. Legends and captions of figures and tables

Table 1 - Animals study design and grafts identification.

ePFTE - expanded polytetrafluoroethylene, ID - internal diameter, MSCs – mesenchymal stem cells.

Table 2 – Patency rate in the experimental groups during the 24 weeks period (mean±SD).

ePFTE - expanded polytetrafluoroethylene, MSCs – mesenchymal stem cells, PVA/Dx – Polyvinyl alcohol hidrogel/Dextran, SD-standard deviation.

Table 3 – Main histopathological findings recorded in the different studied groups.

ePFTE - expanded polytetrafluoroethylene, IH - intimal hyperplasia, MSCs – mesenchymal stem cells, PVA/Dx – Polyvinyl alcohol hidrogel/Dextran, Tr-org - organized thrombus, Tr-norg - non-organized thrombus.

Table 4 – Quantification of immunostaining in tissue samples collected from the peri-graft region (mean±SD).

Dx – Dextran, ePFTE-expanded polytetrafluoroethylene, MSCs – mesenchymal stem cells, PVA – Polyvinyl alcohol hidrogel, ROI – region of interest, SD-standard deviation, a)p<0.005 vs PVA/Dx/MSCs group; b)p<0.005 vs PVA/Dx group.

Table 5 – Fibrous capsule measurements at three different locations in the studied experimental groups (mean±SD).

Dx –Dextran, ePTFE-expanded polytetrafluoroethylene, MSCs – mesenchymal stem cells, NM – not made, PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, SD –standard deviation, a) $p<0.005$ vs PVA/Dx/MSCs group; b) $p<0.005$ vs PVA/Dx group. a) $p<0.005$ vs PVA/Dx/MSCs group; b) $p<0.005$ vs PVA/Dx group.

Graphic 1 – Doppler and B mode measurements during the experimental period (A-internal diameter, B-Resistive index,C-DPV,D-SPV),(mean \pm SD).

DPV – diastolic peak velocity, IR- resistive index, ID –internal diameter, SPV – systolic peak velocity, * $p<0.05$. Group 1(PVA/Dx), Group 2(PVA/Dx+MSCs+AC), Group 3(PVA/Dx+ MSCs), Group 4(ePTFE). PVA–Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx–Dextran,ePTFE-expanded polytetrafluoroethylene, MSCs – mesenchymal stem cells, AC-anticoagulants.

Figure 1 – Image of PVA/Dx graft with 5 cm used for implantation in carotid artery.

PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx – Dextran.

Figure 2 – Aspect of suture pattern at PVA/Dx graft – carotid artery caudal anastomosis.

PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx – Dextran.

Figure 3 – B mode ultrasound image showing acute thrombosis event (24 hours post-surgery) at ePTFE graft – carotid artery caudal anastomosis.

ePTFE - expanded polytetrafluoroethylene.

Figure 4 – Doppler mode ultrasound image showing stenosis at the at PVA/Dx/MSCs graft – carotid artery caudal anastomosis (Group 3).

PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx – Dextran, MSCs – mesenchymal stem cells.

Figure 5 – Detail of PVA/Dx graft partially occluded by thrombus (Group 2).

PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx –Dextran.

Figure 6 – SEM image showing a confluent layer of endothelial cells at the luminal surface of PVA/Dx graft (group 3) explanted at week 24 (amplification 500x).

PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx – Dextran, SEM - Scanning Electronic Microscopy.

Figure 7 – Image of an organized thrombus obstructing the lumen of a PVA/Dx graft explanted from group 1 (PVA/Dx) at week 8(HE staining, 40x).

PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx –Dextran, HE - Hematoxylin and eosin.

Figure 8 – Immunohistochemical detection of endothelial cells with CD31 antibody in paraffin-embedded formalin-fixed sections at PVA/Dx graft – carotid artery cranial anastomosis explanted from group 3 at week 24 (DAB&H staining, 400x).

PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx – Dextran, DAB&H- 3,3'-Diaminobenzidine and hematoxylin.

8. Reference List

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS and others. Heart Disease and Stroke Statistics-2013 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2013;127:e6-e245.
2. Desai ND, Cohen EA, Naylor CD, Fremes SE. A randomized comparison of radial-artery and saphenous-vein coronary bypass grafts. *N Engl J Med* 2004;351:2302-2309.
3. Nomi M, Atala A, Coppi PD, Soker S. Principles of neovascularization for tissue engineering. *Molecular Aspects of Medicine* 2002;23:463-483.
4. Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH. Saphenous Vein Versus PTFE for Above-Knee Femoropopliteal Bypass. A Review of the Literature. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2004;27:357-362.
5. Robinson BI, Fletcher JP, the Australian and New Zealand Femoropopliteal Graft Trial Participants. Fluoropolymer coated Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass grafting: a multicentre trial. *ANZ Journal of Surgery* 2003;73:95-99.
6. Meinhart J, Deutsch M, ZILLA P. Eight Years of Clinical Endothelial Cell Transplantation Closing the Gap Between Prosthetic Grafts and Vein Grafts. *ASAIO Journal* 1997;43.

7. Hassan R, Gholam HK, Mohammad Hadi SM, Patricia K. Patency rate and complications of polytetrafluoroethylene grafts compared with polyurethane grafts for hemodialysis access. *Upsala Journal of Medical Sciences* 2010;115.
8. Desgranges P, Beaujan F, Brunet S, Cavillon A, Qvarfordt P, Melli+re D, Becquemin JP. Cryopreserved Arterial Allografts Used for the Treatment of Infected Vascular Grafts. 1998;12:583-588.
9. Thakrar RR, Patel VP, Hamilton G, Fuller BJ, Seifalian AM. Vitreous cryopreservation maintains the viscoelastic property of human vascular grafts. *The FASEB Journal* 2006;20:874-881.
10. Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot F, Brockbank KG, Taylor MJ. Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nat Biotechnol* 2000;18:296-299.
11. Mingoli A, Edwards JD, Feldhaus RJ, Hunter III, Naspetti R, Cavallari N, Sapienza P, Kretchmar DH, Cavallaro A. Fresh Vein Allograft Survival in Dogs after Cyclosporine Treatment. In: 1996. p 95-102.
12. Moriyama S, Utoh J, Sun LB, Tagami H, Okamoto K, Kunitomo R, Kitamura N. Antigenicity of cryopreserved arterial allografts: comparison with fresh and glutaraldehyde treated grafts. *ASAIO J* 2001;47:202-205.
13. L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, Victor B, Keire P, Wight TN, Chronos NAF, Kyles AE, Gregory CR, Hoyt G and others. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med* 2006;12:361-365.
14. L'Heureux N, Dusserre N, Marini A, Garrido S, de la Fuente L, McAllister T. Technology Insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts[mdash]from research to clinical practice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4:389-395.
15. L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. Tissue-Engineered Blood Vessel for Adult Arterial Revascularization. *N Engl J Med* 2007;357:1451-1453.
16. Hassan C, Peppas N. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods Biopolymers -À PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites. In: Springer Berlin / Heidelberg; 2000. p 37-65.

17. Hyon SH, Cha WI, Ikada Y, Kita M, Ogura Y, Honda Y. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. In: 1994. p 397-406.
18. Kokabi M, Sirousazar M, Hassan ZM. PVA-clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *European Polymer Journal* 2007;43:773-781.
19. Wang LC, Chen XG, Zhong DY, Xu QC. Study on poly(vinyl alcohol)/carboxymethyl-chitosan blend film as local drug delivery system. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2007;18:1125-1133.
20. Kobayashi M, Chang YS, Oka M. A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials* 2005;26:3243-3248.
21. Maruoka S, Matsuura T, Kawasaki K, Okamoto M, Yoshiaki H, Kodama M, Sugiyama M, Annaka M. Biocompatibility of Polyvinylalcohol Gel as a Vitreous Substitute. *Curr Eye Res* 2006;31:599-606.
22. Chaouat M, Le Visage C, Baille WE, Escoubet B, Chaubet F, Mateescu MA, Letourneur D. A Novel Cross-linked Poly(vinyl alcohol) (PVA) for Vascular Grafts. *Adv Funct Mater* 2008;18:2855-2861.
23. Joshi A, Fussell G, Thomas J, Hsuan A, Lowman A, Karduna A, Vresilovic E, Marcolongo M. Functional compressive mechanics of a PVA/PVP nucleus pulposus replacement. *Biomaterials* 2006;27:176-184.
24. Bichara DA, Zhao X, Bodugoz-Senturk H, Ong W, Oral E, Randolph MA, Yaremchuk MJ, Muratoglu OK. Porous Polyvinyl Alcohol-Alginate Gel Hybrid Construct for Neocartilage Formation Using Human Naso-Septal Cells. *Journal of Surgical Research* 2010;158:319-320.
25. Bichara DA, Xing Zao, Bodugoz-Senturk H, Ballyns FP, Ebru Oral, Randolph MA, Bonassar LJ, Gill TJ, Muratoglu. Porous Poly(Vinyl Alcohol)-Hydrogel Matrix-Engineered Biosynthetic Cartilage. *Tissue Engineering: Part A* 2011;17:301-309.
26. Zeerleder S, Mauron T, Lämmle B, Wuillemin WA. Effect of low-molecular weight dextran sulfate on coagulation and platelet function tests. *Thrombosis Research* 2002;105:441-446.

- 1
2
3 27. Abir F, Barkhordarian S, Sumpio BE. Efficacy of Dextran Solutions in Vascular Surgery.
4 Vascular and Endovascular Surgery 2004;38:483-491.
5
6
7 28. Burke AM, Chien S, McMurtry JG, III, Quest DO. Effects of low molecular weight
8 dextran on blood viscosity after craniotomy for intracranial aneurysms. Surg
9 Gynecol Obstet 1979;148:9-15.
10
11 29. Neu B, Wenby R, Meiselman HJ. Effects of Dextran Molecular Weight on Red Blood Cell
12 Aggregation. In: 2008. p 3059-3065.
13
14 30. Alexandre N, Ribeiro J, Gärtner A, Pereira TAIFJ, Lopes A, Fernandes J, Costa E, Santos-
15 Silva A, Santos JD, Mauricio AC and others. Biocompatibility and
16 hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting-In
17 vitro and in vivo studies. J Biomed Mater Res Part A 2014.
18
19 31. Amado S, Simões MJ, Armada da Silva PAS, Luís AL, Shirosaki Y, Lopes MA, Santos JD,
20 Fregnan F, Gambarotta G, Raimondo S and others. Use of hybrid chitosan
21 membranes and N1E-115 cells for promoting nerve regeneration in an
22 axonotmesis rat model. Biomaterials 2008;29:4409-4419.
23
24 32. Paden CM, Watt JA, Selong TH, Paterson CL, Cranston HJ. The neuronal growth-
25 associated protein (GAP)-43 is expressed by corticotrophs in the rat anterior
26 pituitary after adrenalectomy. Endocrinology 2006;147:952-958.
27
28 33. Manczak M, Mao P, Nakamura K, Bebbington C, Park B, Reddy PH. Neutralization of
29 granulocyte macrophage colony-stimulating factor decreases amyloid beta 1-
30 42 and suppresses microglial activity in a transgenic mouse model of
31 Alzheimer's disease. Hum Mol Genet 2009;18:3876-3893.
32
33 34. Choong PF, Mok PL, Cheong SK, Leong CF, Then KY. Generating neuron-like cells from
34 BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro. Cytotherapy 2007;9:170-183.
35
36 35. Pereira T, Gärtner A, Amorim I, Almeida A, Cadeiro A, Armada-da-Silva PAS, Amado S,
37 Fregnan F, Varejão A, Santos JD and others. Promoting nerve regeneration in a
38 neurotmesis rat model using poly(DL-lactide-ε-caprolactone) membranes and
39 mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly: in vitro and in vivo analysis.
40 In: 2014.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
36. Connell JM, Khalapyan T, Al-Mondhry HA, Wilson RP, Rosenberg G, Weiss WJ. Anticoagulation of Juvenile Sheep and Goats With Heparin, Warfarin, and Clopidogrel. *ASAIO Journal* 2007;53.
37. Ruifrok AC, Katz RL, Johnston DA. Comparison of Quantification of Histochemical Staining By Hue-Saturation-Intensity (HSI) Transformation and Color-Deconvolution. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2003;11.
38. Sysel AM, Valli VE, Nagle RB, Bauer JA. Immunohistochemical Quantification of the Vitamin B12 Transport Protein (TCII), Cell Surface Receptor (TCII-R) and Ki-67 in Human Tumor Xenografts. *Anticancer Research* 2013;33:4203-4212.
39. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* 2007;28:5009-5027.
40. Tiwari A, Salacinski H, Seifalian AM, Hamilton G. New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes. *Cardiovascular Surgery* 2002;10:191-197.
41. Siepe M, Akhyari P, Lichtenberg A, Schlensak C, Beyersdorf F. Stem cells used for cardiovascular tissue engineering. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2008;34:242-247.
42. Gui L, Niklason LE. Vascular Tissue Engineering: Building Perfusable Vasculature for Implantation. *Curr Opin Chem Eng* 2014;3:68-74.
43. Ueberrueck T, Tautenhahn J, Meyer L, Kaufmann O, Lippert H, Gastinger I, Wahlers T. Comparison of the ovine and porcine animal models for biocompatibility testing of vascular prostheses. *Journal of Surgical Research* 2005;124:305-311.
44. Byrom MJ, Bannon PG, White GH, Ng MKC. Animal models for the assessment of novel vascular conduits. In: 2010. p 176-195.
45. Berny PJ, de Oliveira LA, Videmann B, Rossi Sp. Assessment of ruminal degradation, oral bioavailability, and toxic effects of anticoagulant rodenticides in sheep. *American Journal of Veterinary Research* 2006;67:363-371.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
46. Koritz GD. Influence of ruminant gastrointestinal physiology on the pharmacokinetics of drugs in dosage forms administered orally. In: Ruckebusch Y, Toutain PL, Koritz G, editors. *Veterinary Pharmacology and Toxicology*: Springer Netherlands; 1983. p 151-163.
47. Toutain PL, Ferran A, Bousquet-Melou A. Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Handb Exp Pharmacol* 2010;19-48.
48. Kapfer X, Meichelboeck W, Groegler FM. Comparison of Carbon-impregnated and Standard ePTFE Prostheses in Extra-anatomical Anterior Tibial Artery Bypass: A Prospective Randomized Multicenter Study. In: 2006. p 155-168.
49. Magee TR, Niblett PG, Campbell WB. Reinforced vascular grafts: a comparative study. *Eur J Vasc Surg* 1992;6:21-25.
50. Pourcelot L. [Indications of Doppler's ultrasonography in the study of peripheral vessels]. *Rev Prat* 1975;25:4671-4680.
51. Tublin ME, Bude RO, Platt JF. The Resistive Index in Renal Doppler Sonography: Where Do We Stand? *American Journal of Roentgenology* 2003;180:885-892.
52. Frauchiger B, Schmid HP, Roedel C, Moosmann P, Staub D. Comparison of Carotid Arterial Resistive Indices With Intima-Media Thickness as Sonographic Markers of Atherosclerosis. *Stroke* 2001;32:836-841.
53. Miyawaki F, How TV, Annis D. Effect of compliance mismatch on flow disturbances in a model of an arterial graft replacement. *Med Biol Eng Comput* 1990;28:457-464.
54. Natacha Andrea Silva Reis Nunes. Modified PVA for vascular grafts. MSC thesis. Porto: FEUP-Universidade do Porto; 2012. p 1-53.
55. Millon LE, Mohammadi H, Wan WK. Anisotropic polyvinyl alcohol hydrogel for cardiovascular applications. *J Biomed Mater Res* 2006;79B:305-311.
56. Gargiulo NJ, Veith FJ, Lipsitz EC, Ohki T, Suggs WD, Cayne NS, Dadian N, Wain RA. Spontaneous recanalization of arterial occlusions: An unusual mechanism for symptomatic improvement. In: 2002. p 1161-1166.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
57. Browse NL. Natural fibrinolysis. *Am Heart J* 1978;95:417-419.
58. Bellon JM, Bujan J, Contreras LA, Hernando A, Jurado F. Similarity in behavior of polytetrafluoroethylene (ePTFE) prostheses implanted into different interfaces. *J Biomed Mater Res* 1996;31:1-9.
59. Davids L, Dower T, Zilla P. The lack of healing in conventional vascular grafts. In: Zilla P, Greisler H, editors. *Tissue engineering of prosthetic vascular grafts*. Austin: R.G.Landes; 1999. p 3-44.
60. Gamble JR, Matthias LJ, Meyer G, Kaur P, Russ G, Faull R, Berndt MC, Vadas MA. Regulation of in vitro capillary tube formation by anti-integrin antibodies. *J Cell Biol* 1993;121:931-943.
61. Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA. Cell-cell interactions in vessel assembly: a model for the fundamentals of vascular remodelling. *Transpl Immunol* 1997;5:177-178.
62. Lee JH, Lee SJ, Khang G, Lee HB. The Effect of Fluid Shear Stress on Endothelial Cell Adhesiveness to Polymer Surfaces with Wettability Gradient. *J Colloid Interface Sci* 2000;230:84-90.
63. Izhar U, Schwab H, Borman JB, Hellener GR, Hotoveli-Salomon A, Marom G, Stern T, Cohn D. Novel synthetic selectively degradable vascular prostheses: a preliminary implantation study. *J Surg Res* 2001;95:152-160.
64. Soldani G, Losi P, Bernabei M, Burchielli S, Chiappino D, Kull S, Briganti E, Spiller D. Long term performance of small-diameter vascular grafts made of a poly(ether)urethaneGÇöpolydimethylsiloxane semi-interpenetrating polymeric network. *Biomaterials* 2010;31:2592-2605.
65. Flameng W, Meuris B, Yperman J, De Visscher G, Herijgers P, Verbeken E. Factors influencing calcification of cardiac bioprostheses in adolescent sheep. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2006;132:89-98.
66. Chiellini E, Corti A, D'Antone S, Solaro R. Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science* 2003;28:963-1014.

- 1
2
3 67. Williams GT, Williams WJ. Granulomatous inflammation-a review. *Journal of Clinical*
4 *Pathology* 1983;36:723-733.
5
6
7 68. Hiroshi Yagi, Alejandro Soto-Gutierrez, Biju Parekkada, Yuko Kitagawa, Ronald
8 G.Tompkins, Naoya Kobayashi, Martin L.Yarmush. Mesenchymal Stem Cells:
9 Mechanisms of Immunomodulation and Homing. In: 2010. p 667-679.
10
11 69. Lindahl P, Christer. Not all myofibroblasts are alike: revisiting the role of PDGF-A and
12 PDGF-B using PDGF-targeted mice. *Current Opinion in Nephrology and*
13 *Hypertension* 1998;7.
14
15 70. Kovacs EJ. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of
16 scar tissue. *Immunology Today* 1991;12:17-23.
17
18 71. Luttkhuizen DT, Harmsen MC, Van Luyn MAJ. Cellular and Molecular Dynamics in the
19 Foreign Body Reaction. *Tissue Engineering* 2006;12:1955-1970.
20
21 72. Andréoletti O, Berthon P, Levavasseur E, Marc D, Lantier Fdr, Monks E, Elsen JM,
22 Schelcher F. Phenotyping of Protein-Prion (PrPsc)-accumulating Cells in
23 Lymphoid and Neural Tissues of Naturally Scrapie-affected Sheep by Double-
24 labeling Immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*
25 2002;50:1357-1370.
26
27 73. Brodbeck WG, Shive MS, Colton E, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson JM. Influence of
28 biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells. *J Biomed*
29 *Mater Res* 2001;55:661-668.
30
31 74. Vozenin MC, Lefaix JL, Ridi R, Biard DSF, Daburon F, Martin M. The myofibroblast
32 markers alpha-SM actin and beta-actin are differentially expressed in 2 and 3-
33 D culture models of fibrotic and normal skin. *Cytotechnology* 1998;26:29-38.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

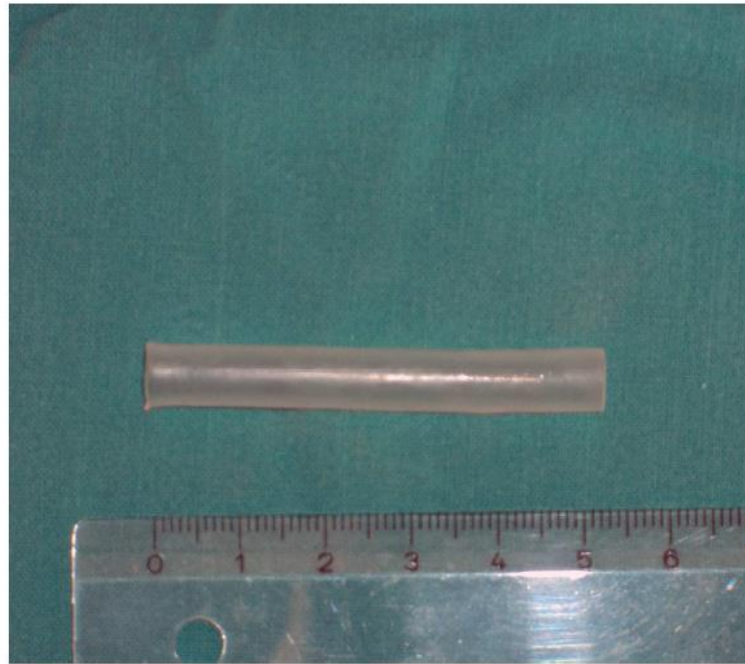


Figure 1 – Image of PVA/Dx graft with 5 cm used for implantation in carotid artery.
PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx – Dextran.
279x247mm (300 x 300 DPI)

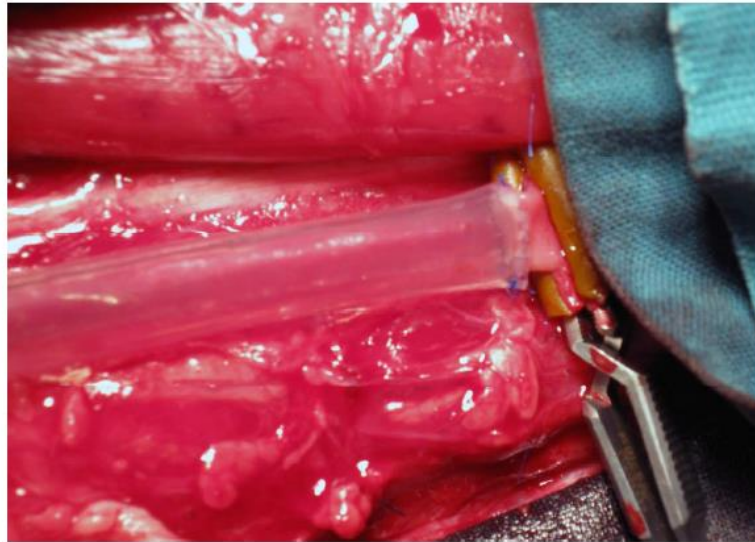


Figure 2 – Aspect of suture pattern at PVA/Dx graft – carotid artery caudal anastomosis.
PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx – Dextran.

462x330mm (180 x 180 DPI)

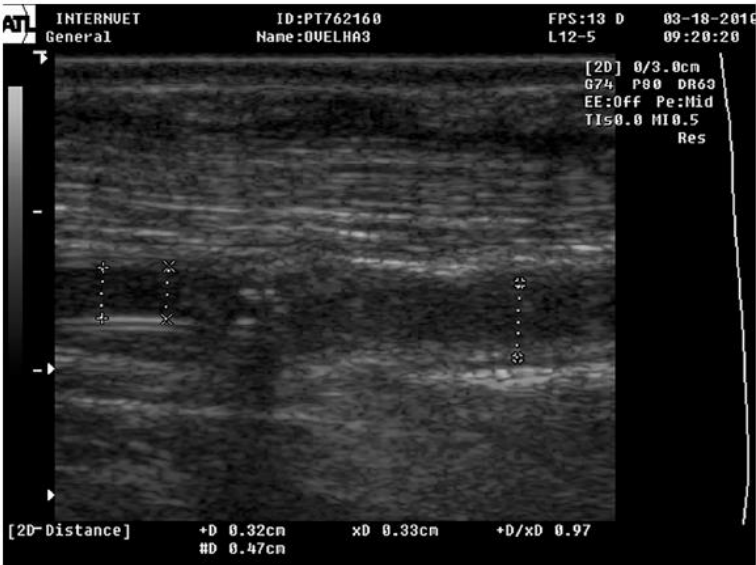


Figure 3 – B mode ultrasound image showing acute thrombosis event (24 hours post-surgery) at ePTFE graft – carotid artery caudal anastomosis.
ePTFE - expanded polytetrafluoroethylene.

127x94mm (300 x 300 DPI)



Figure 4 – Doppler mode ultrasound image showing stenosis at the at PVA/Dx/MSCs graft – carotid artery caudal anastomosis (Group 3).
PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx – Dextran, MSCs – mesenchymal stem cells.

127x95mm (300 x 300 DPI)



Figure 5 – Detail of PVA/Dx graft partially occluded by thrombus (Group 2).
PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx – Dextran.

797x719mm (100 × 100 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

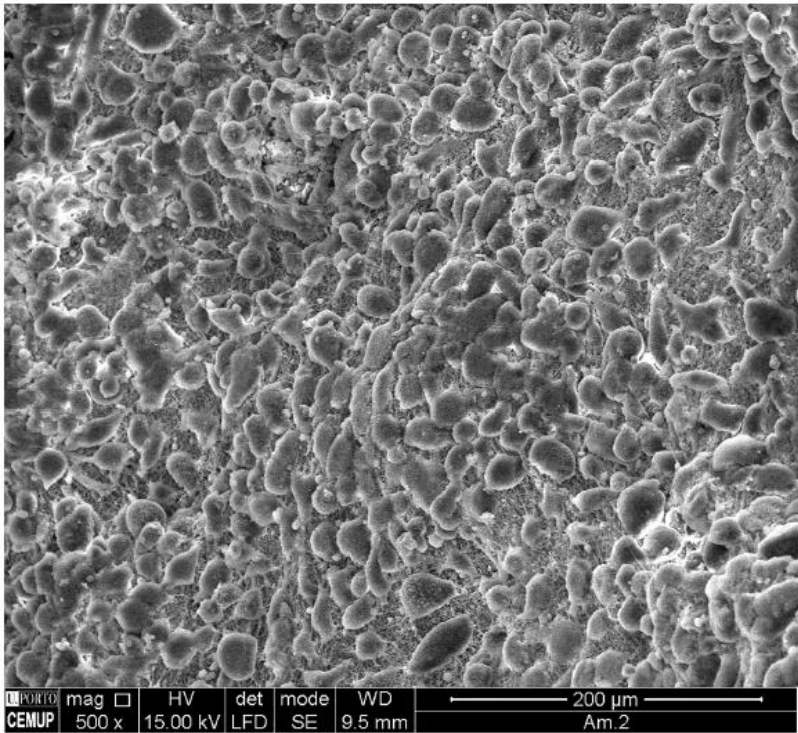


Figure 6 – SEM image showing a confluent layer of endothelial cells at the luminal surface of PVA/Dx graft (group 3) explanted at week 24 (amplification 500x).
PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx – Dextran, SEM – Scanning Electronic Microscopy.

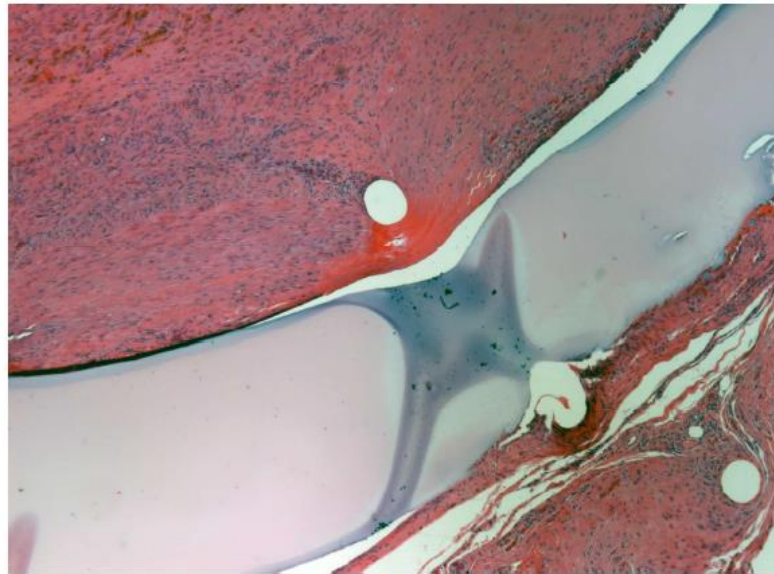


Figure 7 – Image of an organized thrombus obstructing the lumen of a PVA/Dx graft explanted from group 1 (PVA/Dx) at week 8(HE staining, 40x).

PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx –Dextran, HE - Hematoxylin and eosin.

903x666mm (90 x 90 DPI)

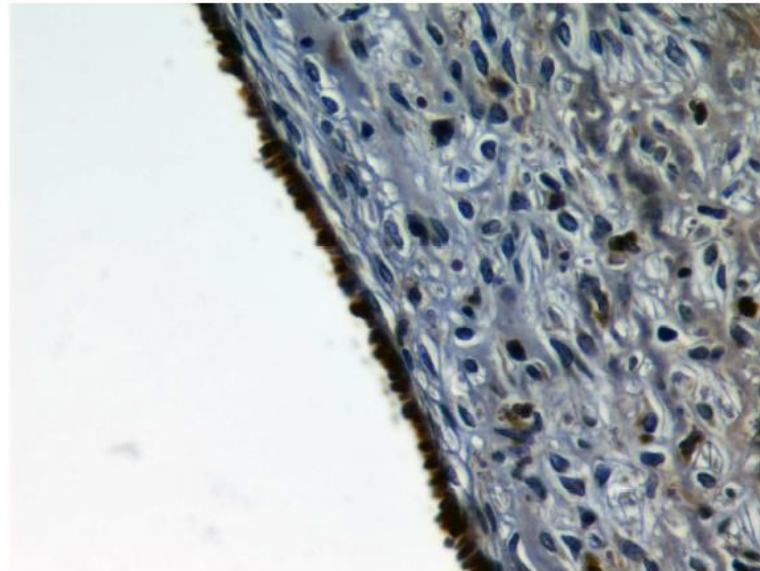


Figure 8 – Immunohistochemical detection of endothelial cells with CD31 antibody in paraffin-embedded formalin-fixed sections at PVA/Dx graft – carotid artery cranial anastomosis explanted from group 3 at week 24 (DAB&H staining, 400x).
902x677mm (90 x 90 DPI)

Table 1 - Animals study design and grafts identification

Animal identification	Type of prosthesis	Length/ID	Time period of implantation
G1.1	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	4 weeks
G1.2	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	8 weeks
G1.3	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	12 weeks
G1.4	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	16 weeks
G1.5	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	20 weeks
G1.6	PVA/Dx	5 cm/ 5 mm	24 weeks
G2.1	PVA/Dx + MSCs + anticoagulant	5 cm/5 mm	4 weeks
G2.2	PVA/Dx + MSCs + anticoagulant	5 cm/5 mm	8 weeks
G2.3	PVA/Dx + MSCs + anticoagulant	5 cm/5 mm	12 weeks
G2.4	PVA/Dx + MSCs + anticoagulant	5 cm/5 mm	16 weeks
G2.5	PVA/Dx + MSCs + anticoagulant	5 cm/5 mm	20 weeks
G2.6	PVA/Dx + MSCs + anticoagulant	5 cm/5 mm	24 weeks
G3.1	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	4 weeks
G3.2	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	8 weeks
G3.3	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	12 weeks
G3.4	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	16 weeks
G3.5	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	20 weeks
G3.6	PVA/Dx + MSCs	5 cm/5 mm	24 weeks
G4.1	ePTFE	5 cm/5 mm	4 weeks
G4.2	ePTFE	5 cm/5 mm	8 weeks
G4.3	ePTFE	5 cm/5 mm	12 weeks
G4.4	ePTFE	5 cm/5 mm	16 weeks
G4.5	ePTFE	5 cm/5 mm	20 weeks
G4.6	ePTFE	5 cm/5 mm	24 weeks

ePTFE-expanded polytetrafluoroethylene, ID-internal diameter, MSCs – mesenchymal stem cells PVA/Dx –Polyvinyl alcohol hidrogel/Dextran,

Table 2 – Patency rate in the experimental groups during the 24 weeks period (mean±SD).

Group	Immediately post-op (%) (n=6)	Day 1 (%) (n=6)	Week 4 (%) (n=6)	Week 8 (%) (n=5)	Week 12 (%) (n=4)	Week 16 (%) (n=3)	Week 20 (%) (n=2)	Week 24 (%) (n=1)	Mean±SD (%)
1- PVA/Dx	100	87.50	12.50	0	0	0	0	0	28.57±42.78
2- PVA/Dx + MSCs+anticoagulants	100	100	42.85	33.33	25	0	0	0	43.02±41.80
3- PVA/Dx + MSCs	100	83.33	33.33	60	50	33.33	50	100	68.33±27.39
4- ePTFE	66.66	83.33	33.33	40	50	66.66	50	100	84.28±24.66

ePTFE-expanded polytetrafluoroethylene, MSCs – mesenchymal stem cells, PVA/Dx –Polyvinyl alcohol hidrogel/Dextran,

Table 3 – Main histopathological findings recorded in the different studied groups.

Parameters evaluated	Group 1 (PVA/Dx)						Group 2 (PVA/Dx + MSCs + anticoagulant)						Group 3 (PVA/Dx + MSCs)						Group 4 (ePTFE)					
Time of collection (weeks)	4	8	12	16	20	24	4	8	12	16	20	24	4	8	12	16	20	24	4	8	12	16	20	24
Luminal surface	Tr-org	Tr-org	IH	Tr-norg	Tr-org	Tr-org	-	Tr-norg	-	Tr-org	Tr-norg	Tr-org	Tr-org	Tr-org	Tr-norg	-	Tr-org	-	Fibrin deposition	Tr-org	IH	IH	Tr-org	IH
Inflammatory reaction	No signs of infection Mild infiltration of macrophage and giant cells						No signs of infection Mild infiltration of macrophage and giant cells						No signs of infection Mild infiltration of macrophage and giant cells						No signs of infection Mild infiltration of macrophage and giant cells except at 4 weeks post-implantation Marked piogranulomatous inflammatory reaction.					
Calcification	No calcification deposits at graft wall.						No calcification deposits at graft wall.						No calcification deposits at graft wall. Calcification of artery wall at caudal graft-artery transition (24 weeks).						No calcification deposits at graft wall.					
Neo-intimal formation and degree of endothelialization	Endothelialization not observed at graft or artery-graft transition.						(12 weeks) Endothelialization at graft-artery transition but not at mid-section of the graft						(16 weeks) IH and endothelialization after recanalization at 16 weeks after implantation						IH and endothelialization at graft-artery transition but not at mid-section of the graft					
Perigraft surface	Fibrous capsule measuring (393.616±188.81µm)						Fibrous capsule measuring (200.77±91.87µm)						Fibrous capsule measuring (300.72±133.52µm)						Fibrous capsule measuring (228.13±129.77µm). Cells biointegrated the vascular prosthesis at 24 weeks					
Material biodegradation	Absent						Absent						Almost absent to absent						Absent					

ePTFE - expanded polytetrafluoroethylene, IH - intimal hyperplasia, MSCs – mesenchymal stem cells, PVA/Dx – Polyvinyl alcohol hidrogel/Dextran, Tr-org - organized thrombus, Tr-norg - non-organized thrombus.

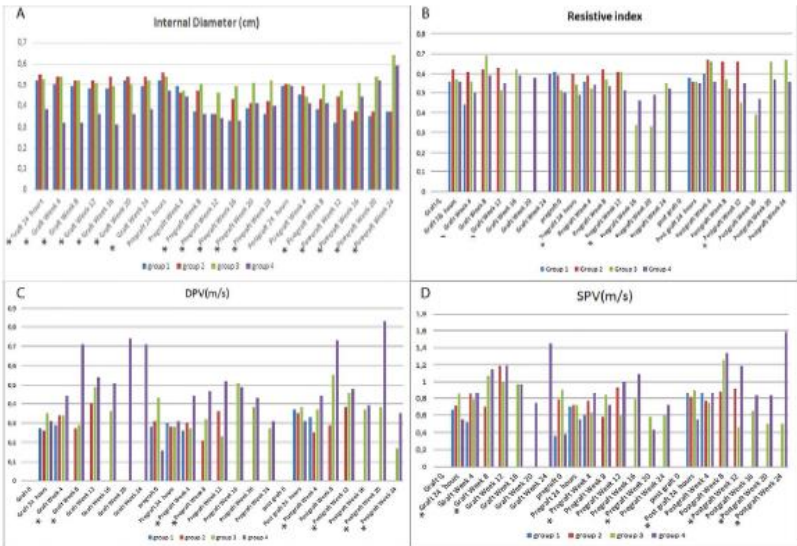
Table 4 – Quantification of immunostaining in tissue samples collected from the peri-graft region (mean±SD).

	CD14 pre graft (cells/ROI), (n=3)			CD14 graft (cells/ROI), (n=3)			CD14 post graft (cells/ROI), (n=3)		
	Group PVA/Dx/MS Cs	Group PVA/Dx	Group ePTFE	Group PVA/Dx/MSCs	Group PVA/Dx	Group ePTFE	Group PVA/Dx/MSCs	Group PVA/Dx	Group ePTFE
Week 4	0±0	19.66±17.50	4.66±3.21	7.66±1.52	16.66±2.30	0±0	3.33±4.93	2±2	6.33±
Week 8	14±10.53	37±14	1±1	12±3.6	19.33±15.04	1±1.73	8.33±2.88	31.33±15.01	4.33±
Week 12	11.66±2.08	0±0	5.33±4.61	10.66±7.37	0±0	7.66±	11.33±11.50	3.60±4	1±1
Week 16	6.82±7	7±1.73	11±6.92	9.29±10.66	0±0	0±0±	12±7.93	5.33±2.30	4±1.73
Week 20	6.33±1.52	7.33±2.30	8.66±10.96	1.66±2.88	5.33±1.15	19±2	5±4.58	0±0	0±0
Week 24	3.78±2.66	3±5.19	10±2.64	1.33±2.30	0.33±0.57	7.66±2.88	0±0	0.66±0.57	5±1
	Alpha-actin pre graft (arbitrary units), (n=3)			Alpha-actin graft (arbitrary units), (n=3)			Alpha-actin post graft (arbitrary units), (n=3)		
	Group PVA/Dx/MS Cs	Group PVA/Dx	Group ePTFE	Group PVA/Dx/MSCs	Group PVA/Dx	Group ePTFE	Group PVA/Dx/MSCs	Group PVA/Dx	Group ePTFE
Week 4	17617.66±7586.88	34611.33±3278.62	33109.66±3026.47	6560.33±5836.86	8655.33±6604.58	493±371.064	12855.66±8998.67	37477.33±3412.88	14259±22985.35
Week 8	33126.33±1256.27	13906.33±4963.94	40044±2413.257	14913.33±10630.03	6372.66±5976.98	8±13.85	12568±7902.77	9649.66±5956.37	39874.33±6042.581
Week 12	21672.66±3745.58	19704.66±12068.81	35966±1963.099	8818.33±8032.5	6912.66±4499.70	252.33±82.397	13495±4092.35	9649.33±7110.89	4134.33±6075.09
Week 16	33899.66±5927	13262.66±1495.78	7916±1318.39	4931±1834.73	4280±1893.42	810.66±757.53	16908.66±5777.82	3295±3646.17	7576±1782.5
Week 20	33225.33±7835.28	40375.33±978.92	3259.66±2001.914	176.66±47.43	1103.66±830.99	476.66±513.51	26271.66±20458.98	36505.66±5623.90	1180.66±1585.4
Week 24	41861.33±494.79	39999±1010.23	7360.33±2651.054	302.66±71.8	2401.33±406.85	252±50.46	18994.66±5256.31	40587.33±2314.97	6367.66±429.76

Table 5 – Fibrous capsule measurements at three different locations in the studied experimental groups (mean±SD).

Time point	Fibrous capsule pre-graft (µm), (n=3)			P value	Fibrous capsule graft (µm), (n=3)			P value	Fibrous capsule post-graft (µm), (n=3)			P value
	Group PVA/Dx/MSCs	Group PVA/Dx	Group ePTFE		Group PVA/Dx/MSCs	Group PVA/Dx	Group ePTFE		Group PVA/Dx/MSCs	Group PVA/Dx	Group ePTFE	
Week 4	190.31±43.35	289.38±32.19a)	112.95±28.079b)	0.030	196.56±36.66	369.78±62.71a)	291.96±11.87	0.006	254.23±27.55	338.66±13.35a)	160±45.02a)b)	0.001
Week 8	144.70±24.48	156.76±14.11	128.20±27.25	0.364	262.96±12.66	282.42±49.18	249.38±48.34	0.627	228.39±21.32	166.09±32.99a)	165.01±12.03a)	0.027
Week 12	65.56±0.92	288.76±24.30a)	107.32±26.72b)	<0.001	280.70±11.45	625.76±104.34a)	354.55±8.95b)	0.001	173.89±19.22	361.05±61.36a)	272±27.48	0.004
Week 16	212.37±17.96	87.51±10.82a)	453.89±58.12a)b)	<0.001	446.90±28.87	228.25±12.82a)	566.11±29.28a)b)	<0.001	160.34±35.10	131.27±40.85	469.70±42.38a)b)	<0.001
Week 20	140.24±15.82	139.25±16.50	301.36±90.210a)b)	0.150	300.72±20	610.94±54.84a)	306.24±24.44b)	<0.001	197.51±14.83	174.68±37.18	219.42±26.94	0.225
Week 24	209.03±39.80	NM	152.14	0.200	576.04±27.72	NM	364.94±104.74	0.100	298.22	NM	205.10±48.43	0.100
Mean±SD	160.37±57.44	192.33±86.93	218.76±52.52	0.342	300.72±133.53	393.61±188.81	228.13±129.77	0.245	218.76±52.52	234.35±104.71	248.59±112.94	0.633

Dx –Dextran, ePTFE-expanded polytetrafluoroethylene, MSCs – mesenchymal stem cells, NM – not made, PVA – Polyvinyl alcohol hydrogel, SD- standard deviation, a)P<0.005 vs PVA/Dx/MSCs group; b)P<0.005 vs PVA/Dx group. a)P<0.005 vs PVA/Dx/MSCs group; b)P<0.005 vs PVA/Dx group.



Graphic 1 – Doppler and B mode measurements during the experimental period (A-internal diameter, B-Resistive index, C-DPV, D-SPV), (mean±SD).
DPV – diastolic peak velocity, IR- resistive index, ID –internal diameter, SPV – systolic peak velocity, *p<0.05. Group 1(PVA/Dx), Group 2(PVA/Dx+MSCs+AC), Group 3(PVA/Dx+ MSCs), Group 4(ePTFE). PVA– Polyvinyl alcohol hydrogel, Dx–Dextran,ePTFE-expanded polytetrafluoroethylene, MSCs – mesenchymal stem cells, AC-anticoagulants.

1099x748mm (72 x 72 DPI)

2.3. Conclusões

A avaliação funcional e estrutural das próteses vasculares de PVA/Dx permitiu chegar às seguintes conclusões:

- I. Foi demonstrado que as **próteses vasculares de baixo diâmetro de PVA/Dx (ID= 5mm)** associadas a MSCs **apresentaram taxas de permeabilidade semelhantes** quando comparadas com as **próteses de ePTFE** de diâmetro equivalente;
- II. As próteses de PVA/Dx apresentam a capacidade de resistir à pressão arterial de grandes artérias num modelo animal de grande porte;
- III. As próteses de PVA/Dx associadas a MSCs induzem uma resposta inflamatória aceitável sem apresentarem biodegradação, permanecendo estruturalmente estáveis durante o período experimental;
- IV. O biomaterial PVA/Dx apesar de ser considerado biocompatível, necessita de ser melhorado em alguns aspectos nomeadamente a porosidade da parede e a velocidade de endotelização com o objectivo de reduzir a formação de trombos luminais.

CAPITULO IV

DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

DISCUSSÃO GERAL

A investigação na área de desenvolvimento de próteses sintéticas vasculares de baixo diâmetro tal como referido anteriormente é um tema de grande importância devido à elevada incidência de doenças cardiovasculares que necessitam de cirurgias de *bypass* ou de revascularização recorrendo-se num grande número destes casos à implantação de próteses vasculares sintéticas.

A ovelha é das espécies mais utilizadas como modelo para a investigação e testagem funcional de dispositivos cardiovasculares nos quais se incluem as próteses vasculares de pequeno diâmetro (Byrom et al., 2010). Existem várias razões que tornam esta espécie um modelo experimental ideal, de entre as quais destacamos a presença de vasos periféricos com diâmetro compatível com próteses de pequeno diâmetro, um sistema de coagulação similar ao do humano e a sua facilidade de manutenção por longos períodos experimentais. A interposição de um enxerto vascular num segmento da artéria carótida comum é um modelo amplamente utilizado pelos investigadores desta área (Soldani et al., 2010; Peirovi et al., 2005; Pavcnik et al., 2009). A avaliação da biocompatibilidade, hemocompatibilidade e trombogenicidade *in vitro* dos biomateriais uma prótese vascular são etapas fundamentais no desenvolvimento deste dispositivo. De modo a uniformizar procedimentos, o desenho experimental e os critérios de classificação é consensualmente aceite que os investigadores desta área devem seguir as linhas orientadoras das normas ISO que existem para esta área de investigação (10 993-4, 10993-6, 7198-1 e 7198-2).

Em relação à avaliação *in vivo* da biocompatibilidade, apenas alguns estudos foram publicados até ao presente avaliando o PVA isoladamente ou associado a outros biomateriais. Principalmente, foram realizados estudos *in vitro* para avaliar a biocompatibilidade, o que têm limitações óbvias em extrapolar os resultados para sistemas mais complexos. Noguchi *et al* testou a biocompatibilidade do PVA sob a forma de cartilagem articular artificial no ambiente intra-articular e intra-muscular (Noguchi et al., 1991). A reacção inflamatória nos tecidos cartilagíneos, osso, membrana sinovial e músculo foi analisada histologicamente. Nos tecidos em que PVA foi implantado, a reacção inflamatória local foi muito leve, confirmando os resultados descritos no nosso trabalho de ligeira irritação para os tecidos circundantes nos grupos experimentais 1, 2, 3 e *sham*. Seo *et al* também estudaram a biocompatibilidade do PVA em combinação com gelatina, implantando o biomaterial no tecido muscular de coelhos (Seo, et al., 2009). Os resultados deste estudo confirmaram igualmente que o PVA induz menor acumulação de

células inflamatórias em relação ao grupo de controlo que foi implantado com poliuretanos. Burczak *et al* utilizaram o PVA para encapsular ilhotas de *Langerhans* em *macrobags* com o objectivo de criar um pâncreas artificial do tipo híbrido (Burczak *et al.*, 1996). A actividade das enzimas fosfatase ácida e alcalina foram medidas no interface tecido - implante. Este estudo teve como objectivo avaliar a actividade das células envolvidas na resposta inflamatória ao implante no longo prazo. Nos períodos experimentais de longo prazo (133 dias) do estudo de Burczak e colaboradores, evidenciou-se uma maior actividade da fosfatase ácida, que é normalmente ligada a uma maior atividade dos macrófagos (Burczak *et al.*, 1996). Pela análise histológica dos diferentes grupos experimentais do nosso trabalho, o número de macrófagos permaneceu estável ou apresentou uma tendência para a diminuir ao longo do período experimental, especialmente no grupo 2 onde o PVA foi associado a um sistema celular. A diferença entre os nossos resultados e os resultados publicados por Burczak e colaboradores podem ser explicados pela utilização de processos diferentes de reticulação que podem influenciar o número de grupos hidroxilo nucleofílicos das macromoléculas de PVA, que interactivam com o componente C3 activando a via alternativa do sistema do complemento que também é responsável pela adesão e activação de macrófagos entre outras células inflamatórias (Sawada, *et al.*, 1993).

O grande número de neovasos, capilares e vénulas observados no interface material-tecido nos diversos grupos que foram implantados com PVA/Dx reforçaram a biocompatibilidade do PVA a longo prazo e confirmaram os resultados de citocompatibilidade *in vitro* descritos por outros autores (Seo *et al.*, 2009).

A reacção de corpo estranho (RCA) que envolveu as membranas de PVA foi suave, especialmente no grupo 3 (PVA/Dx). A copolimerização de PVA com polissacáridos é uma associação cada vez mais comum, devido ao efeito de aumento da biocompatibilidade desta associação (Alhosseini *et al.*, 2012). Diversos estudos sugerem que o dextrano reduz RCA ao limitar a adesão de macrófagos e consequentemente reduzem a sua activação (Abed *et al.*, 2011; Cadée *et al.*, 2000). Estas observações suportam os nossos resultados, que mostraram uma diferença estatisticamente significativa para a contagem de macrófagos entre os grupos que receberam membranas de PVA e grupos que receberam PVA/Dx. Os resultados histológicos demonstraram que a resposta inflamatória em relação ao biomaterial PVA é inferior ou semelhante ao de produtos disponíveis comercialmente, como o ePTFE. Essa reacção inflamatória foi ainda mais atenuada nos implantes de PVA/Dx o que pode ser explicado pela influência

positiva de polissacarídeos na biocompatibilidade, devido aos efeitos anti-inflamatórios destas moléculas (Abed et al., 2011; Alauzun et al., 2010; Li et al., 2012).

Uma acentuada diminuição na inflamação foi detectado nos diversos grupos experimentais e de controlo após as 8 semanas de implantação. Esta tendência foi mais acentuada no grupo onde o PVA foi associado às MSCs. Este resultado deveu-se provavelmente às propriedades imunomoduladoras de MSCs, que permitiram uma mais rápida biointegração do biomaterial e evitaram uma reacção inflamatória local exuberante (Koh & Atala, 2005; Martino, et al., 2012). Estas propriedades imunomoduladoras incluem a supressão de citocinas inflamatórias e a indução de fenótipos reguladores e supressores nos linfócitos T (Yagi et al., 2010). Essas acções foram mais eficazes em fases finais de inflamação onde estas células são mais predominantes

Durante o período de ensaios *in vivo* com membranas de PVA ou ePTFE, as amostras recolhidas não apresentaram biodegradação. Embora o PVA seja descrito na literatura como um polímero biodegradável, o processo de biodegradação descrito na bibliografia é um processo mediado por enzimas microbianas o que impede a sua degradação por enzimas de mamíferos (Chiellini, Corti, et al., 2003).

A associação de diferentes polímeros com polissacarídeos naturais ou artificiais é uma tendência em ciência de biomateriais. A sua utilização crescente está relacionada com as propriedades imunomoduladoras, anti-coagulantes e anti-inflamatórios que levam a uma melhor biocompatibilidade da associação resultante. No nosso conhecimento PVA nunca foi testado quanto à biocompatibilidade e hemocompatibilidade em associação com dextrano. Os resultados apresentados suportam a utilização desta copolimerização como um enxerto vascular em um modelo animal pré - clínico, também a associação com MSCs a partir de geleia de cordão umbilical de *Wharton* melhora a biointegração do biomaterial modular a reacção inflamatória local.

As membranas de PVA com dextrano apresentaram um valor de índice de hemólise muito baixo o que foi atribuída aos efeitos citoprotectores de dextrano em eritrócitos. O dextrano é um glicosaminoglicano que tem sido utilizado por vários autores como uma substância profiláctica de hemólise, no entanto, o mecanismo que produz este efeito é mal conhecido (Eisenberg, 1969). Este polissacarídeo também afecta a estabilidade da membrana e cria uma carga eléctrica negativa na superfície, criando forças de repulsão

entre os eritrócitos, diminuindo a agregação e hemólise (Fernandes, Cesar, & Barjas-Castro, 2011; Fernandes et al., 2008).

A avaliação da trombogenicidade *in vitro* e *in vivo* constituiu uma componente fundamental da caracterização das interações dos materiais com o sangue. Nessa perspectiva realizaram-se várias provas de avaliação para caracterizar a activação das plaquetas e cascata de coagulação.

A análise das superfícies incubadas com plasma rico em plaquetas (PRP) por microscopia electrónica de varrimento (MEV) permitiu a avaliação da morfologia das plaquetas pela modificação da forma e pelo desenvolvimento pseudopodes para definir a activação destes elementos celulares. Entre outros parâmetros, a forma de plaquetas que adere a superfícies ou seja o grau de activação é uma das características de hemocompatibilidade (Xu et al., 2010).

Nas superfícies das membranas de PVA/Dx, observou-se uma predominância de formas discóides ou dendríticas sem agregação plaquetária sugerindo uma fraca activação. A hidrofiliçidade da superfície de PVA/Dx pode explicar este resultado pela menor adsorção de fibrinogénio a estas superfícies (Sivaraman & Latour, 2010). Quando o fibrinogénio é adsorvido a uma superfície, ocorre uma modificação da sua estrutura que expõe locais para a adesão dos receptores das plaquetas e consequente activação (Sivaraman & Latour, 2010).

No presente trabalho, o número de plaquetas que aderiram a cada superfície testada foi quantificada pela actividade da lactato desidrogenase (LDH). Uma percentagem e um número significativamente ($p < 0,05$) mais baixo de plaquetas aderiram as superfícies de PVA/Dx e polipropileno quando comparadas com o vidro. No ensaio com plasma rico em plaquetas (PRP) de ovino, as membranas de PVA/Dx tinham um número significativamente menor de plaquetas na superfície quando comparados com o polipropileno. Apesar do menor número e percentagem de plaquetas que aderiram à superfície de PVA/Dx, algumas superfícies podem não suportar a adesão de plaquetas mas, por outro lado, podem ainda assim activar as plaquetas (Godo & Sefton, 1999; Hanson & Tucker, 2013). O PVA tem sido descrito como um biomaterial que ativa as plaquetas com uma baixa grau de adesão mesmo com pré-tratamento com fibrinogénio (Godo & Sefton, 1999).

O sangue total foi utilizado para determinar os tempos de coagulação e fornecer informações sobre a trombogenicidade e atividade pró-coagulante de cada biomaterial. Neste teste, o sangue total é deixada a coagular em contacto com o biomaterial. Quando o processo de coagulação ocorre, mais eritrócitos são retidos no coágulo de fibrina e, consequentemente, menos hemoglobina é libertada pela lise de eritrócitos causada pela adição de água destilada. Um material mais hemocompatível manterá um valor de absorção mais elevada ao longo do tempo. Os resultados mostraram que o polipropileno e PVA/Dx eram os materiais menos trombogénicos. Os nossos resultados estão de acordo com outras publicações, que testaram o PVA em combinação com polissacarídeos naturais (como a celulose)(Leitão, et al., 2013). A área de superfície, para além das características intrínsecas dos biomateriais, é outro factor que pode influenciar os valores do tempo de coagulação do sangue total (Andrade et al., 2011). A fim de reduzir a influência desse factor, o polipropileno e amostras de PVA/Dx foram cortadas com o objectivo de cobrir completamente o fundo do poço da placa onde se realizou o teste. No caso de PVA/Dx, quando hidratado apresenta uma estrutura em forma de cúpula. Este facto pode aumentar a superfície de interação sangue - material o que pode afetar negativamente a análise comparativa dos resultados.

O perfil de recalcificação plasma é frequentemente utilizado como medida de ativação da via intrínseca (Motlagh et al., 2006; Zhuo, Siedlecki, & Vogler, 2006). O desempenho dos biomateriais neste teste é exclusivamente um indicador da activação fase de contacto. Apesar dos resultados para PVA/Dx terem sido inferiores ao controlo positivo. No entanto, quando em comparação com outros copolímeros que incluem PVA, o tempo de recalcificação (*half-max time*) de PVA/Dx é superior aos resultados publicados (Leitão et al., 2013) .

A geração de trombina foi medida indirectamente através da determinação complexo de trombina-antitrombina (TAT) por ELISA. O TAT é um parâmetro de ativação da coagulação por contacto. Os resultados obtidos para TAT foram mais baixos para PVA/Dx sendo inclusive inferiores aos do controlo negativo. Apesar da via de coagulação intrínseca, a trombina é considerado o principal iniciador da cascata de coagulação sanguínea no caso específico do contacto do sangue com superfícies de biomateriais. O mecanismo pelo qual a trombina é gerada na superfície de polímero do biomaterial não é ainda totalmente conhecido. No entanto, a formação de pequenas quantidades de trombina através da ativação por contato com biomateriais poderia induzir um ciclo de amplificação usando as propriedades de ativação da trombina sobre Fator XI (Minnema, ten Cate, & Hack, 1999). A trombina é responsável pela conversão do fibrinogénio em

fibrina, é igualmente capaz de estimular a activação de plaquetas para a formação de trombos. Por todas estas razões a síntese trombina é um evento-chave nas reações biocompatibilidade/ incompatibilidade. Um valor mais baixo de síntese de trombina é um indicador de hemocompatibilidade

Após a cirurgia (em ambos os grupos experimentais) os valores do tempo parcial de tromboplastina activada não subiram como tem sido descrito por vários autores (Boisclair et al., 1993; Irvine et al., 1991). Os dados obtidos evidenciaram que os valores de tempo de protrombina foram constantes durante o período experimental de 16 semanas. Adicionalmente, os valores obtidos antes e após a cirurgia não foram significativamente diferentes. Apesar dos resultados obtidos, não se pode concluir somente com base nas determinações de ambas as vias de coagulação sobre o papel das próteses vasculares de PVA/Dx no processo de trombose *in vivo*.

O D-Dímero é um biomarcador amplamente utilizado na avaliação da fibrinólise endógena. No presente trabalho, houve um aumento estatisticamente significativo dos níveis deste marcador ($p < 0,05$) após a cirurgia em ambos os grupos experimentais. Esta descoberta pode estar relacionado com a formação de trombos ou simplesmente relacionada com o procedimento cirúrgico. A cinética observada nos níveis de D-dímeros estava de acordo com a cinética observada noutros pacientes cirúrgicos, onde o valor mais elevado foi observado nos 7 dias seguintes à cirurgia (Dindo et al., 2009). Este aumento dos níveis de D-dímeros pode estar relacionado com o processo de inflamação induzido pela cirurgia e pelo dano tecidular associado (Iba et al., 2007).

Os resultados obtidos para a proteína C-reactiva (PCR) e IL - 6 mostraram que os valores não aumentaram após a cirurgia nem estavam relacionados com um aumento do número de leucócitos. Nos seres humanos, a cinética dos níveis de IL-6 e PCR foram inter-relacionados e um aumento no nível de PCR é precedida por um aumento dos níveis de IL - 6 (Cruickshank, et al., 1990). A Invasão do procedimento cirúrgico também é um fator que pode influenciar os níveis e a cinética de PCR e IL- 6 (Cruickshank et al., 1990). Em uma pequena cirurgia ou procedimentos cirúrgicos menos invasivos, como o acesso à artéria carótida cervical, pode produzir-se um nível menor de PCR devido a um menor grau de trauma de tecidos. Por fim, em ambos os grupos e em ambas as medições (PCR e IL-6), os níveis consistentemente diminuíram após a cirurgia facto que pode estar relacionado com o baixo grau de invasão do acesso cirúrgico.

Quanto aos resultados da contagem de leucócitos, da contagem de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do hematócrito, todos os valores mantiveram-se entre os valores normais para a espécie durante o período de 16 semanas, com exceção de um grupo no ponto de temporal-12 semanas. No grupo 1, 4 dias após a cirurgia, observou-se uma diminuição nos três primeiros parâmetros referidos, mas ainda assim dentro dos limites normais, o que pode ser atribuído à perda de sangue intra-operatória.

A contagem de leucócitos manteve-se dentro dos limites normais, sendo observado um aumento não significativo após a cirurgia (4 dias após a cirurgia). Essa subida é, provavelmente, ligado ao dano tecidual inerente à cirurgia e à inflamação aguda associada. A contagem diferencial de leucócitos também esteve dentro dos limites normais para ovinos (Wilhelmi et al., 2012). A contagem de plaquetas manteve-se igualmente dentro dos limites normais, o que reflecte um fraco consumo de plaquetas pelas próteses vasculares de PVA/Dx.

Em relação à avaliação funcional, o principal objetivo deste trabalho experimental foi o de produzir uma prótese vascular funcional de PVA com dextrano. O desempenho estrutural e funcional das próteses de baixo diâmetro de PVA/Dx foi avaliado num estudo pré-clínico de longo prazo. Neste estudo, a taxa de permeabilidade primária em enxertos de PVA/Dx foi inferior ao registrado no grupo ePTFE. No entanto, nas próteses de PVA/Dx associadas a MSCs, a taxa de permeabilidade atingiu valores semelhantes ao biomaterial de referência. A endotelização da superfície luminal do enxerto é o principal factor que contribui para a baixa trombogenicidade e por consequência para o aumento da taxa de permeabilidade a longo prazo. O uso de MSCs humanas da geleia de *Wharton* do cordão umbilical para gerar células endoteliais nos vasos sanguíneos da engenharia de tecidos é uma tendência atual da engenharia de tecidos. No entanto, o nosso objectivo com a injeção peri-enxerto de MSCs foi estimular endotelização mediada pelo crescimento tecidual trans-mural e para modular a resposta inflamatória observada após o procedimento cirúrgico a fim de melhorar a regeneração vascular e a biointegração do enxerto. Apesar da melhoria das taxas de permeabilidade no grupo 3, não se observou crescimento transmural de tecido em enxertos explantados do grupo 3 e as células endoteliais detectadas por MEV às 24 semanas pós-implantação devem ser atribuídas à endotelização trans-anatômica (TAE) (Zilla et al., 2007). O TAE é um achado comum em ovelhas particularmente em animais jovens mas não em animais adultos. No nosso caso, foram utilizados animais adultos (6 anos de idade), o que mesmo assim permitiu endotelização de superfícies luminas em enxertos de PVA/Dx (Zilla et al., 2007). O uso de protocolos de anticoagulação, semelhantes aos utilizados nos pacientes humanos

submetidos a procedimentos de *bypass* vascular não resultou numa melhoria da taxa de permeabilidade ($43,02 \pm 41,80\%$) no grupo 2. Este facto foi surpreendentemente devido a comprovada alta biodisponibilidade da warfarina quando administrada por via oral em ruminantes. Os implantes ePTFE usados no nosso estudo, apresentavam a superfície luminal revestida por carbono o que diminui a adesão plaquetária e a deposição de fibrina, quando comparados as próteses clássicas de ePTFE. Esta particularidade pode ser responsável pela maior taxa de permeabilidade observada ($84,28 \pm 24,66\%$) neste grupo. Os valores de diâmetro interno das próteses de PVA/Dx mantiveram-se constante em relação ao diâmetro interno inicial (5 mm), sugerindo que estes enxertos permanecem estruturalmente estáveis durante o período de 24 semanas. Pelo contrário, os enxertos de ePTFE mostraram uma diminuição no ID especificamente após as oito semanas de implantação. Estes resultados sugerem uma maior resistência à compressão das próteses de PVA/Dx em comparação com as próteses de ePTFE. Em relação às características do fluxo, o índice de resistência (RI) de acordo com *Pourcelot* é um parâmetro hemodinâmico que reflecte a resistência vascular ao fluxo. Os valores mais elevados do RI foram observados no grupo 2. No âmbito do nosso trabalho experimental, o aumento de RI pode estar relacionado com a estenose do vaso/prótese causada pela hiperplasia da íntima ou pela formação de trombos luminais (Figura 13). A aceleração do fluxo sanguíneo observada em enxertos de ePTFE implantados pode estar relacionada com a maior discordância de diâmetro entre as próteses e as artérias anastomosadas. Os ID dos enxertos ePTFE apresentaram valores inferiores a quatro milímetros enquanto que a secção transversal das artérias nativas apresentou valores mais baixos sujeitando o fluxo sanguíneo a uma aceleração. Outra característica implicada na aceleração do fluxo é a incompatibilidade de complacência, que é de particular importância na fisiopatologia da hiperplasia da íntima. Nas próteses de PVA/Dx os valores de SPV foram menores quando comparados com os enxertos ePTFE. Como sugerido, as propriedades viscoelásticas das próteses de PVA/Dx assemelham-se a das artérias nativas, o que pode explicar essa observação. Em relação ao desempenho estrutural, não se observou rotura dos enxertos PVA/Dx o que reflecte a capacidade desses enxertos para suportar a pressão arterial e confirma as propriedades mecânicas demonstradas *in vitro* (Nunes, 2012). Os testes mecânicos *in vitro* das próteses de PVA/Dx demonstraram que esses podem suportar até $3,8 \pm 0,3$ bar de pressão na parede, valor que está dentro dos limites suportados pelas artérias nativas (2,7 e 5,6 bar) (Nunes, 2012).

De acordo com as observações das amostras através do microscópio electrónico de varrimento, não houve crescimento tecidual trans-mural. O principal factor que contribui para infiltração de células ou tecidos na parede da prótese é a dimensão dos poros ou

dos interstícios da estrutura do biomaterial. Para que este processo seja bem sucedido é necessário haver espaço suficiente para os capilares e as células do tecido conjuntivo se infiltrarem. Na prótese de PVA/Dx, o diâmetro médio observado dos poros foi de $8,15 \pm 5,50 \mu\text{m}$ (intervalo 1-22 μm) o que é insuficiente para um vaso capilar (diâmetro médio de 10 μm) e arteríolas funcionais (diâmetro médio de $23,1 \pm 13,1 \mu\text{m}$) penetrarem nos interstícios. Outras células, como as células musculares lisas e os macrófagos que se seguem e estimulam a migração transmural das células endoteliais não foram observadas na parede da prótese. A presença de células endoteliais na superfície luminal do enxerto de PVA/Dx às 24 semanas (Figura 13) foi atribuída à hidrofiliabilidade do PVA. Reconhece-se que a adesão e proliferação de diferentes tipos de células em materiais poliméricos dependem em grande medida as características de superfície, tais como a molhabilidade hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, a carga eléctrica da superfície e a rugosidade entre outras características.

Os achados histopatológicos nas transições da artéria-prótese confirmaram as observações em MEV (Figura 13). A endotelização e a neoíntima de suporte foram restritas à porção mais caudal e cranial das próteses de PVA/Dx e de ePTFE. A endotelização incompleta nos enxertos de PVA/Dx e ePTFE pode ser explicada pelas dificuldades encontradas pelos capilares presentes no tecido peri-enxerto na penetração da estrutura densa da prótese. Um comportamento semelhante foi observado por Izhar *et al.* com um tipo de prótese de baixo diâmetro implantados na artéria carótida comum de cães, que atribuíram a ausência de células endoteliais e crescimento capilar à baixa porosidade do enxerto (Izhar *et al.*, 2001). Outro aspecto a ter em conta na endotelização incompleta foi o curto período de experimentação do nosso trabalho, quando comparado com o trabalho desenvolvido por Solani *et al.* (Soldani *et al.*, 2010). Este trabalho utilizou ovelhas implantadas com uma prótese biodegradável por um período de 24 meses ao contrário dos 6 meses planeados para o nosso trabalho. No grupo experimental de PVA/Dx que não recebeu a MSCs, a falta de endotelização pode explicar um valor inferior da taxa permeabilidade precoce (às 4 semanas foi de 0%).

Os níveis observados de fibrose foram indirectamente relacionados com um menor grau de activação de macrófagos induzida pelo PVA ($p < 0,05$). Os enxertos de PVA/Dx associados a MSCs apresentaram resultados inferiores quando comparados com outros grupos. Estas diferenças estatisticamente significativas foram evidentes na região do enxerto na semana 4, semana 12 e na semana 20. O que sugere que, quando MSCs são injetados na interface peri- enxerto, a fibrose é diminuída. Esta circunstância pode ser explicada pela acção imunossupressora das MSCs em macrófagos que se reflecte na diminuição da síntese de factores de crescimento que são responsáveis pelo crescimento de fibroblastos (expresso histologicamente como fibrose). A marcação das células

endoteliais pelo anticorpo CD31 (Figura 13) não foi eficaz em enxertos previamente observados com células endoteliais por MEV ou microscopia óptica. Tal resultado é explicado pela fraca afinidade deste anticorpo por células previamente fixadas com formolaldeído. A quantificação dos macrófagos foi realizada através da marcação com o anticorpo CD14. Como esperado, o número de células marcadas aumentou desde as 4 semanas até alcançar um pico entre as 8 semanas e 16 semanas em grupos de PVA/Dx. No longo prazo, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) na contagem de macrófagos nos tecidos envolventes das próteses de PVA/Dx e ePTFE. Os macrófagos são provavelmente as células mais importantes na inflamação crónica e uma maior contagem no tecido envolvente geralmente evidencia maior antigenicidade e menor biocompatibilidade (Brodbeck et al., 2001).

Em resumo após a análise conjunta dos dados de biocompatibilidade, hemocompatibilidade, trombogenicidade e da avaliação funcional podemos concluir que as próteses de PVA/Dx apresentaram resultados promissores que merecem um trabalho futuro com o objectivo de se melhorar alguns aspectos do seu desempenho funcional e estrutural nomeadamente a porosidade e a funcionalidade da superfície luminal.

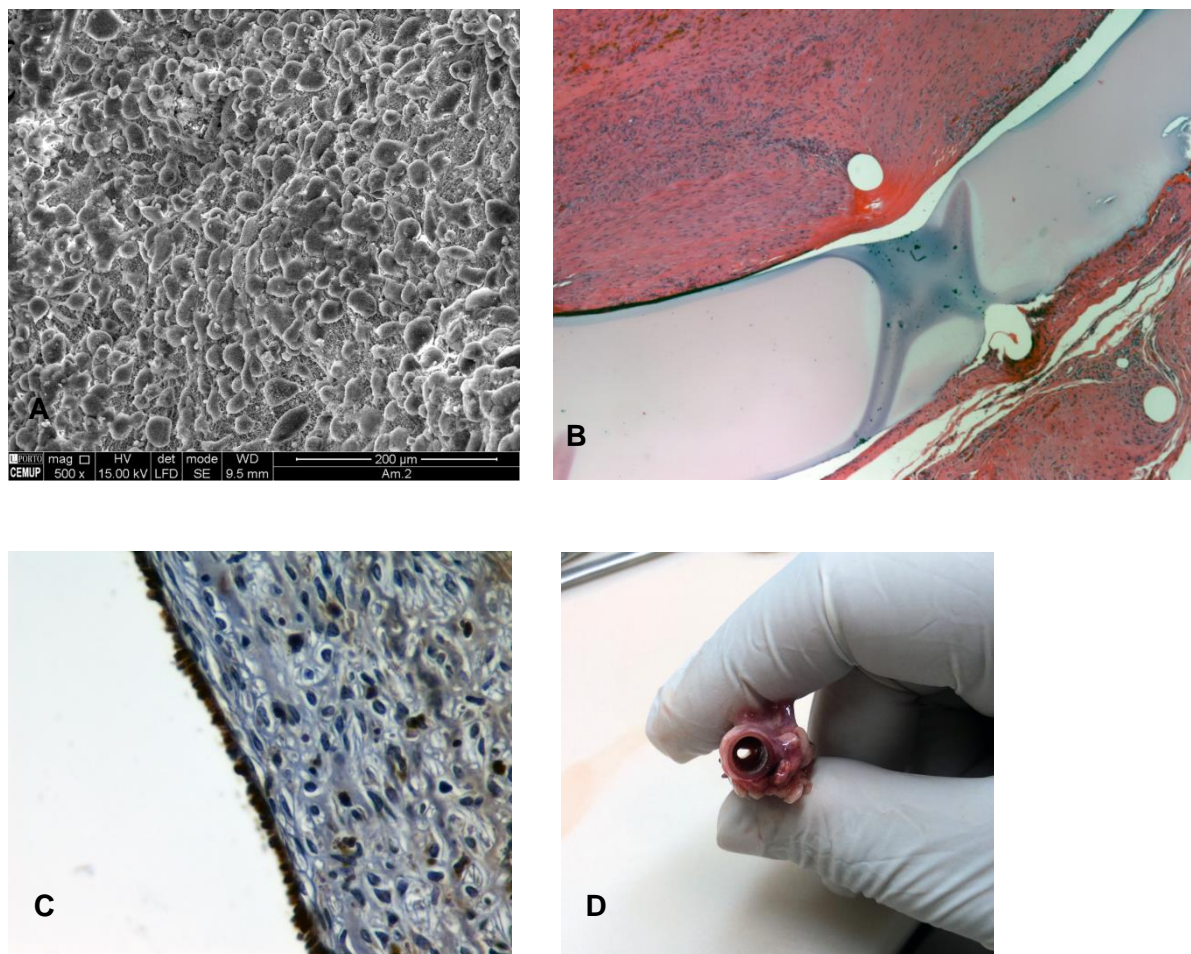


Figura 13 - (A), Imagem de MEV (500x) onde se observa um endotélio a revestir a superfície luminal de uma prótese de PVA/Dx; (B), Aspecto de oclusão do lúmen da prótese de PVA/Dx por trombo (H&E, 40X); (C), Imagem de endotélio marcado pelo anticorpo CD31 na transição anastomose-prótese PVA/Dx (DAB&H, 400x); Aspecto macroscópico de oclusão parcial do lúmen de prótese de PVA/Dx por um trombo.

CONCLUSÕES E PRESPECTIVAS FUTURAS

Após terem sido definidos os objectivos iniciais do nosso trabalho experimental e estabelecido o plano de trabalho foram realizados os testes de biocompatibilidade, hemocompatibilidade e trombogenicidade *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente foram realizados ensaios de desempenho funcional e estrutural num modelo de animal de grande porte. Deste trabalho foram obtidos os resultados apresentados no capítulo anterior que podemos sintetizar nos seguintes pontos:

- I. Pelos ensaios de biocompatibilidade *in vivo* determinou-se que o biomaterial PVA/Dx é ligeiramente irritante para os tecidos envolventes causando uma reacção inflamatória compatível com a sua utilização como prótese vascular.
- II. O PVA/DX é biomaterial não hemolítico podendo ser utilizado com segurança em dispositivos médicos que contactam com o sangue.
- III. Os resultados dos estudos *in vitro* da activação e adesão plaquetária demonstraram que o PVA/Dx é biomaterial inerte na interacção com as plaquetas.
- IV. A activação do sistema de coagulação pelo contacto com o biomaterial PVA/Dx à luz foi considerada segura para uma utilização enquanto prótese vascular. Os resultados da quantificação do tempo de coagulação para o PVA/Dx foram inclusive inferiores aos resultados publicados de outras combinações de PVA com polissacáridos (PVA e celulose).
- V. As próteses vasculares de PVA/Dx associadas a um sistema celular (células estaminais mesenquimatosas) apresentaram o melhor desempenho funcional em relação aos grupos com próteses de PVA/Dx. Não sendo no entanto claro o mecanismo que levou a esse melhor desempenho funcional. A avaliação do fluxo sanguíneo evidenciou um fluxo laminar com excepção das medições nas semanas 20 e 24 do grupo PVA/Dx/MSCs onde se observou um fluxo turbulento.
- VI. As próteses de PVA/Dx mantiveram-se íntegras durante todo o período experimental, mantendo o seu diâmetro interno estável durante 24 semanas.
- VII. A avaliação *in vivo* da hemocompatibilidade e trombogenicidade confirmou os resultados obtidos *in vitro*. Os marcadores da inflamação e da activação da coagulação mantiveram-se dentro dos limites normais durante um período de 16 semanas.
- VIII. A avaliação estrutural das próteses de PVA/Dx e dos tecidos envolventes através de técnicas de histologia e imunohistoquímica demonstrou que o sistema celular - MSCs melhora a biocompatibilidade reduzindo a espessura da cápsula fibrosa e a infiltração por macrófagos em alguns dos pontos temporais. A endotelização das

superfícies luminais foi observada apenas nas áreas junto às anastomoses em algumas das amostras (12, 16 semanas e 24 semanas) do grupo PVA/Dx/MSCs. O que reforça a necessidade de se adoptar uma estratégia para estimular a endotelização precoce das superfícies. Macroscopicamente não se observou a formação de aneurismas em próteses de PVA/Dx o que reforça a boa resistência mecânica desta prótese a pressão arterial

Os resultados obtidos no nosso estudo funcional demonstraram que é possível manter uma prótese vascular de PVA/Dx permeável durante 24 semanas com um endotélio funcional. A associação das próteses de PVA/Dx a um sistema celular resultou num melhor desempenho funcional não estando no entanto claro o mecanismo que levou a esse resultado.

Um resultado que se nos apresentou surpreendente foi a ineficácia da administração de fármacos anticoagulantes no desempenho funcional das próteses vasculares de PVA/Dx sugere que a terapêutica anticoagulante num modelo experimental como ovino necessita de ser ajustado ou até incluir novos fármacos que consigam ser mais eficazes.

O número elevado de oclusões e trombos nos outros dois grupos experimentais que utilizaram PVA e Dx abre perspectivas futuras à funcionalização da superfície com adsorção de moléculas que inibam a coagulação como a heparina(Klement, et al., 2002), a antitrombina, a hirudina(Fu, et al., 1995; Heise et al., 2006) ou a trombomodulina(Jordan & Chaikof, 2007). Outra opção será incorporação de fragmentos de péptidos RGD que facilitem a adesão de células endoteliais e células progenitoras das células endoteliais às superfícies promovendo a endotelização de forma mais rápida (Alobaid et al., 2006). A modificação da estrutura da parede nomeadamente tornando-a mais porosa para permitir a endotelização transmural poderá ser outro aspecto a melhorar para acelerar a endotelização e melhorar a sua taxa de permeabilidade a longo prazo (Zilla et al., 2007).

As perspectivas futuras no desenvolvimento de enxertos vasculares de pequeno diâmetro (< 6 mm) focam-se em nossa opinião pela utilização cada vez mais generalizada de metodologias de engenharia de tecidos para a produção de enxertos vasculares. Em nossa opinião a abordagem *in situ* prevalecerá sobre as outras abordagens. Na variante *in situ* da engenharia de tecido vascular, evita-se o extenso período de tempo em cultura *in vitro* e fabrica-se um enxerto vascular celular ou acelular que tem as propriedades essenciais de um enxerto vascular, aproveitando o potencial das células autólogas para

regenerar o enxerto vascular *in vivo*. Nesta abordagem de engenharia de tecidos, utiliza-se uma matriz biodegradável (que pode estar semeada ou não com células autólogas) que vai sendo lentamente degradada e substituída pela estrutura do vaso nativo *in situ*. Como esta abordagem não necessita de um período longo de cultivo como na abordagem *in vitro*, a produção pode fazer-se em grande escala -se e os enxertos estão disponíveis *off-the-shelf*, por estas razões acreditamos que será a tendência de futuro na produção de enxertos vasculares por engenharia de tecidos.

A produção *in vitro* de enxertos vasculares utilizando células autólogas irá desenvolver-se no futuro ao nível das metodologias e técnicas com o objectivo de ultrapassar as falhas. Contudo, o seu fabrico nunca atingirá a produção em larga escala e irá aproximar-se de um outro conceito emergente em Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos, a *Personalized Medicine* ou *Tailored Medicine* (Wystrychowski et al., 2013; McAllister et al., 2009; L'Heureux et al., 2007; Shinoka & Breuer, 2008; Smart, Martin, & Parker, 2004). Assim sendo esta tecnologia será utilizado em casos muito específicos em que seja permitida uma abordagem electiva, tendo em conta que o período de tempo necessário para a produção dos vasos por esta via pode atingir vários meses.

O desenvolvimento da Engenharia de tecidos, e o conhecimento cada vez mais detalhado da regeneração dos tecidos, tem vindo nos últimos anos a apresentar-se como uma alternativa cada vez mais utilizada no tratamento das doenças cardiovasculares em Medicina humana. Espera-se que este trabalho possa ter contribuído para o desenvolvimento da Medicina Regenerativa, em especial no desenvolvimento de próteses sintéticos de pequeno diâmetro bem como abrir perspectivas para a continuação desta investigação.

CAPITULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulhannan, P., Russell, D. A., & Homer-Vanniasinkam, S. (2012). Peripheral arterial disease: a literature review. *British Medical Bulletin*, 104, 21-39.

Abed, A., Assoul, N., Ba, M., Derkaoui, S. M., Portes, P., Louedec, L. et al. (2011). Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96A, 535-542.

Abir, F., Barkhordarian, S., & Sumpio, B. E. (2004). Efficacy of Dextran Solutions in Vascular Surgery. *Vascular and Endovascular Surgery*, 38, 483-491.

Adams, H. P. (1-12-2010). Management of Carotid Artery Stenosis: Endarterectomy or Stenting? Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic 85[12], 1071-1072.

Affolter, J. T., Newby, D. E., Wilkinson, I. B., Winter, M. J., Balment, R. J., & Webb, D. J. (2002). No effect on central or peripheral blood pressure of systemic urotensin II infusion in humans. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 54, 617-621.

Aggarwal, S., Qamar, A., Sharma, V., & Sharma, A. (2011). Abdominal aortic aneurysm: A comprehensive review. *Exp.Clin.Cardiol.*, 16, 11-15.

Ahmed, M., Ghanbari, H., Cousins, B. G., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2011). Small calibre polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposite cardiovascular grafts: influence of porosity on the structure, haemocompatibility and mechanical properties. *Acta Biomater.*, 7, 3857-3867.

Ahn, C. Y., Shaw, W. W., Berns, S., & Markowitz, B. L. (1994). Clinical experience with the 3M microvascular coupling anastomotic device in 100 free-tissue transfers. *Plast.Reconstr.Surg.*, 93, 1481-1484.

Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K. et al. (2003). Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat.Med.*, 9, 1370-1376.

- Akers, D. L., Du, Y. H., & Kempczinski, R. F. (1993). The effect of carbon coating and porosity on early patency of expanded polytetrafluoroethylene grafts: an experimental study. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 18, 10-15.
- Akhtar, M. S. (2010). Use of cyanoacrylate compounds in vascular anastomosis. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 63, 1063-1064.
- Alauzun, J. G., Young, S., D'Souza, R., Liu, L., Brook, M. A., & Sheardown, H. D. (2010). Biocompatible, hyaluronic acid modified silicone elastomers. *Biomaterials*, 31, 3471-3478.
- Alhosseini, S. N., Moztarzadeh, F., Mozafari, M., Asgari, S., Dodel, M., Samadikuchaksaraei, A. et al. (2012). Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *Int.J.Nanomedicine.*, 7, 25-34.
- Alimi, Y., Juhan, C., Morati, N., Girard, N., & Cohen, S. (1994). Dilation of woven and knitted aortic prosthetic grafts: CT scan evaluation. *Ann.Vasc.Surg*, 8, 238-242.
- Alobaid, N., Salacinski, H. J., Sales, K. M., Ramesh, B., Kannan, R. Y., Hamilton, G. et al. (1-7-2006). Nanocomposite Containing Bioactive Peptides Promote Endothelialisation by Circulating Progenitor Cells: An In vitro Evaluation. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 32[1], 76-83.
- Alobaid, N., Salacinski, H. J., Sales, K. M., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2005). Single stage cell seeding of small diameter prosthetic cardiovascular grafts. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 33, 209-226.
- Amado, S., Simões, M. J., Armada da Silva, P. A. S., Lu+js, A. L., Shirosaki, Y., Lopes, M. A. et al. (2008). Use of hybrid chitosan membranes and N1E-115 cells for promoting nerve regeneration in an axonotmesis rat model. *Biomaterials*, 29, 4409-4419.
- Andrade, F. K., Silva, J. P., Carvalho, M., Castanheira, E. M. S., Soares, R., & Gama, M. (2011). Studies on the hemocompatibility of bacterial cellulose. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 98A, 554-566.

- Andukuri, A., Sohn, Y. D., Anakwenze, C. P., Lim, D. J., Brott, B. C., Yoon, Y. S. et al. (2013). Enhanced human endothelial progenitor cell adhesion and differentiation by a bioinspired multifunctional nanomatrix. *Tissue Eng Part C: Methods*, 19, 375-385.
- Antonios, V. S., Noel, A. A., Steckelberg, J. M., Wilson, W. R., Mandrekar, J. N., Harmsen, W. S. et al. (2006). Prosthetic vascular graft infection: a risk factor analysis using a case-control study. *J Infect.*, 53, 49-55.
- Arroyo-Espliguero, R., Avanzas, P., Cosin-Sales, J., Aldama, G., Pizzi, C., & Kaski, J. C. (2004). C-reactive protein elevation and disease activity in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J*, 25, 401-408.
- Asahara, T., Bauters, C., Zheng, L. P., Takeshita, S., Bunting, S., Ferrara, N. et al. (1995). Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*, 92, 11365-11371.
- Asahara, T. & Kawamoto, A. (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C572-C579.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T. et al. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275, 964-967.
- Avci-Adali, M., Stoll, H., Wilhelm, N., Perle, N., Schlensak, C., & Wendel, H. P. (2013). In vivo tissue engineering: mimicry of homing factors for self-endothelialization of blood-contacting materials. *Pathobiology*, 80, 176-181.
- Avci-Adali, M., Ziemer, G., & Wendel, H. P. (2010). Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization--a review of current strategies. *Biotechnol. Adv.*, 28, 119-129.
- Avci-Adali, M., Paul, A., Ziemer, G., & Wendel, H. P. (2008). New strategies for in vivo tissue engineering by mimicry of homing factors for self-endothelialisation of blood contacting materials. *Biomaterials*, 29, 3936-3945.
- Bader, M. (2008). *Cardiovascular Hormone Systems: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutics*. 1^a Ed. John Wiley & Sons, Weinheim, Germany.
- Badylak, S. F., Record, R., Lindberg, K., Hodde, J., & Park, K. (1998). Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 9, 863-878.

- Bailes, J. E., Quigley, M. R., Cerullo, L. J., & Kwaan, H. C. (1987). Review of tissue welding applications in neurosurgery. *Microsurgery.*, 8, 242-244.
- Bailly, A. L., Laurent, A., Lu, H., Elalami, I., Jacob, P., Mundler, O. et al. (1996). Fibrinogen binding and platelet retention: Relationship with the thrombogenicity of catheters. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30, 101-108.
- Baksh, D., Yao, R., & Tuan, R. S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem.Cells.*, 25, 1384-1392.
- Baldwin, B. A. & Bell, F. R. (1963a). Blood flow in the carotid and vertebral arteries of the sheep and calf. *J Physiol.*, 167, 448-462.
- Baldwin, B. A. & Bell, F. R. (1963b). The anatomy of the cerebral circulation of the sheep and ox. The dynamic distribution of the blood supplied by the carotid and vertebral arteries to cranial regions. *J Anat.*, 97, 203-215.
- Baldwin, B. A. & Bell, F. R. (1963c). The effect of temporary reduction in cephalic blood flow on the EEG of Sheep and Calf. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.*, 15, 465-475.
- Baldwin, B. A. & Bell, F. R. (1963d). The effect on blood pressure in the sheep and calf of clamping some of the arteries contributing to the cephalic circulation. *J Physiol.*, 167, 463-479.
- Barocas, V. H., Girton, T. S., & Tranquillo, R. T. (1998). Engineered alignment in media equivalents: magnetic prealignment and mandrel compaction. *J Biomech.Eng.*, 120, 660-666.
- Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., & Brooks, H. (2012). *Ganong's Review of Medical Physiology, 24th Ed.* McGraw-Hill Education.
- Basmdjian, D., Sefton, M. V., & Baldwin, S. A. (1997). Coagulation on biomaterials in flowing blood: some theoretical considerations. *Biomaterials*, 18, 1511-1522.
- Bassiouny, H. S., White, S., Glagov, S., Choi, E., Giddens, D. P., & Zarins, C. K. (1992a). Anastomotic intimal hyperplasia: mechanical injury or flow induced. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 15, 708-716.

- Bassiouny, H. S., White, S., Glagov, S., Choi, E., Giddens, D. P., & Zarins, C. K. (1992b). Anastomotic intimal hyperplasia: Mechanical injury or flow induced. *Journal of Vascular Surgery*, 15, 708-717.
- Basu, S., Wang, S., Robertazzi, R., Grubbs, P. E., Jacobowitz, I., Rose, D. et al. (1988). In vitro bursting strength studies of laser-welded tissue and comparison with conventional anastomosis. *J.Vasc.Surg.*, 7, 420-422.
- Bauer, J., Dau, C., Cavarape, A., Schaefer, F., Ehmke, H., & Parekh, N. (1999). ANG II- and TxA(2)-induced mesenteric vasoconstriction in rats is mediated by separate cell signaling pathways. *Am J Physiol*, 277, H1-H7.
- Bax, D. V., McKenzie, D. R., Bilek, M. M. M., & Weiss, A. S. (2011). Directed cell attachment by tropoelastin on masked plasma immersion ion implantation treated PTFE. *Biomaterials*, 32, 6710-6718.
- Bearn, P. E., McCollum, C. N., & Greenhalgh, R. M. (1993). The influence of collagen and albumen pre sealants on knitted Dacron grafts. *Eur.J Vasc.Surg*, 7, 271-276.
- Bellosta, R., Natalini, G., Luzzani, L., Carugati, C., & Sarcina, A. (2013). Comparison of precuffed expanded polytetrafluoroethylene and heparin-bonded polytetrafluoroethylene graft in crural bypass. *Ann.Vasc.Surg*, 27, 218-224.
- Berardinelli, L. (2006). Grafts and Graft Materials as Vascular Substitutes for Haemodialysis Access Construction. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 32, 203-211.
- Berceli SA (2010). Autogenous vein grafts. In Cronenwett JL & Wayne Johnston K (Eds.), *Vascular Surgery* (7th ed., pp. 1316-1334). Philadelphia: Saunders.
- Berger, P., Van Herwaarden, J. A., Harkisoen, S., De Vries, J. P., Ekkelenkamp, M., & Moll, F. L. (2012). Surgical treatment of infected aortic grafts. *J Cardiovasc Surg (Torino)*.
- Berliner, J., Leitinger, N., Watson, A., Huber, J., Fogelman, A., & Navab, M. (1997). Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action. *Thromb.Haemost.*, 78, 195-199.
- Berry, C., Touyz, R., Dominiczak, A. F., Webb, R. C., & Johns, D. G. (2001). Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am.J Physiol.Heart Circ.Physiol.*, 281, H2337-H2365.

- Bianco, R. W., Wasiluk, K. R., Voight, J. M., Lahti, M. T., Rivard, A. L., & Gallegos, R. P. (2013a). Chapter II.3.7 - Large Animal Models in Cardiac and Vascular Biomaterials Research and Assessment. In B.D.Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, & J. E. Lemons (Eds.), *Biomaterials Science*. 3^a Ed. pp. 653-676. Academic Press.
- Bianco, R. W., Wasiluk, K. R., Voight, J. M., Lahti, M. T., Rivard, A. L., & Gallegos, R. P. (2013b). Chapter II.3.7 - Large Animal Models in Cardiac and Vascular Biomaterials Research and Assessment. In B.D.Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, & J. E. Lemons (Eds.), *Biomaterials Science*. 3^a Ed. pp. 653-676. Academic Press.
- Bichara DA, Xing Zao, Bodugoz-Senturk, H., Ballyns, F. P., Ebru Oral, Randolph, M. A. et al. (2011). Porous Poly(Vinyl Alcohol)-Hydrogel Matrix-Engineered Biosynthetic Cartilage. *Tissue Engineering: Part A*, 17, 301-309.
- Bichara, D. A., Zhao, X., Bodugoz-Senturk, H., Ong, W., Oral, E., Randolph, M. A. et al. (2010). Porous Polyvinyl Alcohol-Alginate Gel Hybrid Construct for Neocartilage Formation Using Human Naso-Septal Cells. *Journal of Surgical Research*, 158, 319-320.
- Bittl, J. A. (1996). Coronary stent occlusion: thrombus horribilis. *J Am Coll.Cardiol.*, 28, 368-370.
- Blakemore, A. H. & Voorhees, A. B., Jr. (1954). The use of tubes constructed from vinyon N cloth in bridging arterial defects; experimental and clinical. *Ann.Surg.*, 140, 324-334.
- Bluestein, D., Rambod, E., & Gharib, M. (2000). Vortex shedding as a mechanism for free emboli formation in mechanical heart valves. *J Biomech.Eng*, 122, 125-134.
- Boisclair, M. D., Lane, D. A., Philippou, H., Esnouf, M. P., Sheikh, S., Hunt, B. et al. (1993). Mechanisms of thrombin generation during surgery and cardiopulmonary bypass [see comments]. *Blood*, 82, 3350-3357.
- Boretos, J. W. & Pierce, W. S. (1967). Segmented polyurethane: a new elastomer for biomedical applications. *Science.*, 158, 1481-1482.
- Bowman, H. W. (1953). Clinical evaluation of dextran as a plasma volume expander. *J.Am.Med.Assoc.*, 153, 24-26.
- Brain, S. D., Hughes, S. R., Cambridge, H., & O'Driscoll, G. (1993). The contribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP) to neurogenic vasodilator responses. *Agents and Actions*, 38, C19-C21.

- Brems, J., Castaneda, M., & Garvin, P. J. (1986). A five-year experience with the bovine heterograft for vascular access. *Arch.Surg.*, 121, 941-944.
- Brodbeck, W. G., Shive, M. S., Colton, E., Nakayama, Y., Matsuda, T., & Anderson, J. M. (2001). Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells. *J Biomed Mater Res*, 55, 661-668.
- Brodersen, R., Bijlsma, F., Gori, K., Jensen, K. T., Chen, W., Dominguez, J. et al. (1998). Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64, 1-13.
- Brown, J., Chen, Q., & Hong, G. (1997). An autocrine system for C-type natriuretic peptide within rat carotid neointima during arterial repair. *Am J Physiol*, 272, H2919-H2931.
- Budras, K. D. (2007). *Anatomy of the Dog*. 5^a ed. Manson Publishing. Schluetersche, Germany.
- Burczak, K., Gamian, E., & Kochman, A. (1996). Long-term in vivo performance and biocompatibility of poly(vinyl alcohol) hydrogel macrocapsules for hybrid-type artificial pancreas. *Biomaterials*, 17, 2351-2356.
- Burke, A. M., Chien, S., McMurtry, J. G., III, & Quest, D. O. (1979). Effects of low molecular weight dextran on blood viscosity after craniotomy for intracranial aneurysms. *Surg.Gynecol.Obstet.*, 148, 9-15.
- Busse, R. & Fleming, I. (1998). Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res*, 35, 73-84.
- Byrom, M. J., Bannon, P. G., White, G. H., & Ng, M. K. C. (1-7-2010). Animal models for the assessment of novel vascular conduits. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 52(1), 176-195.
- Cabellon S Jr, Moncrief, C. L., Pierre, D. R., & Cavanaugh, D. G. (1983). Incidence of abdominal aortic aneurysms in patients with atheromatous arterial disease. *Am.J.Surg.*, 146, 575-576.

- Cabrera Fischer, E. I., Bia, S. D., Cassanello, G. L., Zocalo, Y., Crawford, E. V., Casas, R. F. et al. (2005). Reduced elastic mismatch achieved by interposing vein cuff in expanded polytetrafluoroethylene femoral bypass decreases intimal hyperplasia. *Artif.Organs*, 29, 122-130.
- Cadée, J. A., van Luyn, M. J. A., Brouwer, L. A., Plantinga, J. A., van Wachem, P. B., de Groot, C. J. et al. (2000). In vivo biocompatibility of dextran-based hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research*, 50, 397-404.
- Caiati, J. M., Madigan, J. D., Bhagat, G., Benvenisty, A. I., Nowygrod, R., & Todd, G. J. (1-7-2000). Vascular Clips Have No Significant Effect on the Cellular Proliferation, Intimal Changes, or Peak Systolic Velocity at Anastomoses in Rabbit Vein Grafts. *The Journal of surgical research* 92(1), 29-35.
- Calles-Vazquez, M. C., Crisostomo, V., Sun, F., & Uson-Gargallo, J. (2007). Angiographic, ultrasonographic, and macroscopic assessment of aortic growth after VCS clips, interrupted polypropylene, or running polyglycolic acid anastomosis. *J.Pediatr.Surg.*, 42, 1695-1702.
- Carrel A & Guthrie CC (1906). Uniterminal and biterminal venous transplantations. *Surg.Gynecol.Obstet.*, 2, 266.
- Castier, Y., Francis, F., Cerceau, P., Besnard, M., Albertin, J., Fouilhe, L. et al. (2005). Cryopreserved arterial allograft reconstruction for peripheral graft infection. *J Vasc.Surg*, 41, 30-37.
- Catani, M. V., Bernassola, F., Rossi, A., & Melino, G. (1998). Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 249, 275-278.
- Chambers, B. R., You, R. X., & Donnan, G. A. (2000). Carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. *Cochrane.Database.Syst.Rev*, CD001923.
- Chaouat, M., Le Visage, C., Baille, W. E., Escoubet, B., Chaubet, F., Mateescu, M. A. et al. (2008). A Novel Cross-linked Poly(vinyl alcohol) (PVA) for Vascular Grafts. *Advanced Functional Materials*, 18, 2855-2861.
- Chataigneau, T., Félétou, M., Thollon, C., Villeneuve, N., Vilaine, J., Duhault, J. et al. (1998). Cannabinoid CB1 receptor and endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig carotid, rat mesenteric and porcine coronary arteries. *British Journal of Pharmacology*, 123, 968-974.

- Chemla, E. S. & Morsy, M. (2009). Randomized clinical trial comparing decellularized bovine ureter with expanded polytetrafluoroethylene for vascular access. *Br.J Surg.*, 96, 34-39.
- Chen, H., Yuan, L., Song, W., Wu, Z., & Li, D. (2008). Biocompatible polymer materials: Role of protein-GC surface interactions. *Progress in Polymer Science*, 33, 1059-1087.
- Chen, H., Zhang, Z., Chen, Y., Brook, M. A., & Sheardown, H. (2005). Protein repellent silicone surfaces by covalent immobilization of poly(ethylene oxide). *Biomaterials*, 26, 2391-2399.
- Cheng, M., Guan, X., Li, H., Cui, X., Zhang, X., Li, X. et al. (2013). Shear stress regulates late EPC differentiation via mechanosensitive molecule-mediated cytoskeletal rearrangement. *PLoS.One.*, 8, 67-75.
- Chiellini, E., Corti, A., D'Antone, S., & Solaro, R. (2003). Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science*, 28, 963-1014.
- Chilton, R. J. (2004). Pathophysiology of Coronary Heart Disease: A Brief Review. *JAOA: Journal of the American Osteopathic Association*, 104, 5S-8S.
- Cho, A. B. & Júnior, R. M. (2008). Application of fibrin glue in microvascular anastomoses: Comparative analysis with the conventional suture technique using a free flap model. *Microsurgery*, 28, 367-374.
- Cho, A. B., Wei, T. H., Torres, L. R., Júnior, R. M., Rugiero, G. M., & Aita, M. A. I. (2009). Fibrin glue application in microvascular anastomosis: Comparative study of two free flaps series. *Microsurgery*, 29, 24-28.
- Christenson, J. T., Arvidsson, D., Thorne, J., Olsson, P. I., Norgren, L., & Strand, S. E. (1983). A comparison of two methods of labelling autologous platelets with ¹¹¹In-oxine in five different species. *Eur.J Nucl.Med*, 8, 389-392.
- Christenson, J. T., Thulesius, O., Owunwanne, A., & Nazzari, M. (1991). Forskolin impregnation of small calibre PTFE grafts lowers early platelet graft sequestration and improves patency in a sheep model. *Eur.J Vasc Surg*, 5, 271-275.
- Chu, A., Stakely, A., Lin, C. C., & Cobb, F. R. (1989). Effects of atrial natriuretic peptide on transmural blood flow and reactive hyperemia in the presence of flow-limiting coronary

stenosis in the awake dog: evidence for dilation of the intramural vasculature. *Circ.Res.*, 64, 600-606.

Clark, R. A., Nielsen, L. D., Welch, M. P., & McPherson, J. M. (1995). Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. *J Cell Sci.*, 108 (Pt 3), 1251-1261.

Clowes, A. W., Gown, A. M., Hanson, S. R., & Reidy, M. A. (1985). Mechanisms of arterial graft failure. 1. Role of cellular proliferation in early healing of PTFE prostheses. *The American journal of pathology*, 118, 43-54.

Clowes, A. W., Kirkman, T. R., & Clowes, M. M. (1986). Mechanisms of arterial graft failure. II. Chronic endothelial and smooth muscle cell proliferation in healing polytetrafluoroethylene prostheses. *Journal of vascular surgery , North American Chapter* 3, 877-884.

Cobbett, J. (1967). Small vessel anastomosis. A comparison of suture techniques. *Br.J.Plast.Surg.*, 20, 16-20.

Connell, J. M., Khalapyan, T., Al-Mondhiry, H. A., Wilson, R. P., Rosenberg, G., & Weiss, W. J. (2007). Anticoagulation of Juvenile Sheep and Goats With Heparin, Warfarin, and Clopidogrel. *ASAIO Journal*, 53.

Corea, F., Spinelli, M., Tambasco, N., Silvestrelli, G., & Parnetti, L. (2006). Secondary prevention of cardioembolic stroke: oldest and newest promises. *Clin.Exp.Hypertens.*, 28, 413-420.

Cornelius, R. M. & Brash, J. L. (1993). Identification of proteins absorbed to hemodialyser membranes from heparinized plasma. *J Biomater.Sci.Polym.Ed*, 4, 291-304.

Cruickshank, A. M., Fraser, W. D., Burns, H. J., Van, D. J., & Shenkin, A. (1990). Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin.Sci.(Lond)*, 79, 161-165.

Cui, X., Zhang, X., Guan, X., Li, H., Li, X., Lu, H. et al. (2012). Shear stress augments the endothelial cell differentiation marker expression in late EPCs by upregulating integrins. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 425, 419-425.

- Cziperle, D. J., Joyce, K. A., Tattersall, C. W., Henderson, S. C., Cabusao, E. B., Garfield, J. D. et al. (1992). Albumin impregnated vascular grafts: albumin resorption and tissue reactions. *J Cardiovasc Surg (Torino.)*, 33, 407-414.
- Dahl, S. L., Koh, J., Prabhakar, V., & Niklason, L. E. (2003a). Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant.*, 12, 659-666.
- Dahl, S. L., Koh, J., Prabhakar, V., & Niklason, L. E. (2003b). Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant.*, 12, 659-666.
- Daly, C. D., Campbell, G. R., Walker, P. J., & Campbell, J. H. (2004). In vivo engineering of blood vessels. *Front.Biosci.*, 9, 1915-1924.
- Darby, C. R., Roy, D., Deardon, D., & Cornall, A. (2006). Depopulated bovine ureteric xenograft for complex haemodialysis vascular access. *Eur.J Vasc.Endovasc.Surg.*, 31, 181-186.
- Dardik, H., Ibrahim, I. M., & Dardik, I. (1976). Arteriovenous fistulas constructed with modified human umbilical cord vein graft. *Arch.Surg*, 111, 60-62.
- Dauids L, Dower T, & Zilla P (1999). The lack of healing in conventional vascular grafts. In Zilla P & Greisler H (Eds.), *Tissue engineering of prosthetic vascular grafts* (pp. 3-44). Austin: R.G.Landes.
- De Cicco, F., Reverchon, E., Adami, R., Auriemma, G., Russo, P., Calabrese, E. C. et al. (2014). In situ forming antibacterial dextran blend hydrogel for wound dressing: SAA technology vs. spray drying. *Carbohydrate Polymers*, 101, 1216-1224.
- de Mel, A., Cousins, B. G., & Seifalian, A. (2012). SurfaceModification of Biomaterials: A Quest for Blood Compatibility. *International Journal of Biomaterials*, 2012, 1-8.
- de Mel, A., Murad, F., & Seifalian, A. M. (2011). Nitric Oxide: A Guardian for Vascular Grafts? *Chemical Reviews*, 111, 5742-5767.
- de Souza Costa-Júnior, E., Pereira, M., & Mansur, H. (2009). Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 553-561.
- De Visscher, G., Plusquin, R., Mesure, L., & Flameng, W. (2010). Selection of an Immunohistochemical Panel for Cardiovascular Research in Sheep. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 18.

- Denk, M. J., Longaker, M. T., Basner, A. L., Glat, P. M., Karp, N. S., & Kasabian, A. K. (1995). Microsurgical reconstruction of the lower extremity using the 3M microvascular coupling device in venous anastomoses. *Ann.Plast.Surg.*, 35, 601-606.
- Derkaoui, S. M., Labbé, A. I., Purnama, A., Gueguen, V., Barbaud, C., Avramoglou, T. et al. (2010). Films of dextran-graft-polybutylmethacrylate to enhance endothelialization of materials. *Acta Biomaterialia*, 6, 3506-3513.
- Desai, N. D., Cohen, E. A., Naylor, C. D., & Fries, S. E. (2004a). A randomized comparison of radial-artery and saphenous-vein coronary bypass grafts. *N.Engl.J Med.*, 351, 2302-2309.
- Desai, N. D., Cohen, E. A., Naylor, C. D., & Fries, S. E. (2004b). A Randomized Comparison of Radial-Artery and Saphenous-Vein Coronary Bypass Grafts. *New England Journal of Medicine*, 351, 2302-2309.
- Deutsch, M., Meinhart, J., Zilla, P., Howanietz, N., Gorlitzer, M., Froeschl, A. et al. (2009). Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc.Surg*, 49, 352-362.
- Dibner-Dunlap, M. E., Kinugawa, T., & Thames, M. D. (1993). Activation of cardiac sympathetic afferents: effects of exogenous adenosine and adenosine analogues. *Am.J Physiol.*, 265, H395-H400.
- Didisheim, P. (1985). Comparative hematology in the human, calf, sheep and goat: relevance to implantable blood pump evaluation. *ASAIO J*, 8, 123-127.
- Dindo, D., Breitenstein, S., Hahnloser, D., Seifert, B., Yakarisik, S., Asmis, L. M. et al. (2009). Kinetics of D-dimer after general surgery. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 20.
- Dobrin, P. B. (1978). Mechanical properties of arterises. *Physiol Rev*, 58, 397-460.
- Dobrin, P. B., Littooy, F. N., & Endean, E. D. (1989). Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery*, 105, 393-400.
- Dobrin, P. B., Littooy, F. N., Golan, J., Blakeman, B., & Fareed, J. (1988). Mechanical and histologic changes in canine vein grafts. *The Journal of surgical research*, 44, 259-265.
- Dorsam, R. T. & Kunapuli, S. P. (2004). Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin.Invest*, 113, 340-345.

- Drake, C. J. (2003). Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C. Embryo Today*, 69, 73-82.
- Dunn, P. F., Newman, K. D., Jones, M., Yamada, I., Shayani, V., Virmani, R. et al. (1996). Seeding of vascular grafts with genetically modified endothelial cells. Secretion of recombinant TPA results in decreased seeded cell retention in vitro and in vivo. *Circulation*, 93, 1439-1446.
- Dyce, K. M., Sack, W. O., & Wensing, C. J. G. (2009). *Textbook of Veterinary Anatomy*. 4^a Ed. Saunders/Elsevier.
- Eberhart, R. C. & Clagett, C. P. (1991). Catheter coatings, blood flow, and biocompatibility. *Semin. Hematol.*, 28, 42-48.
- Edmunds, L. H., Jr. (1996). Is prosthetic valve thrombogenicity related to design or material? *Tex. Heart Inst. J*, 23, 24-27.
- Edmunds, L. H., Jr. (2001). Evolution of prosthetic heart valves. *Am Heart J*, 141, 849-855.
- Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J., & Weston, A. H. (1998). K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, 396, 269-272.
- Egorova, A. D., DeRuiter, M. C., de Boer, H. C., van de Pas, S., Gittenberger-de Groot, A. C., van Zonneveld, A. J. et al. (2012). Endothelial colony-forming cells show a mature transcriptional response to shear stress. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim*, 48, 21-29.
- Eisenberg, S. (1969). The Effect of Low Molecular Weight Dextran on the Viscosity and Suspension Characteristics of Blood. *The American Journal of the Medical Sciences*, 257.
- Elakkiya, T., Sheeja, R., Ramadhar, K., & Natarajan, T. S. (2013). Biocompatibility studies of electrospun nanofibrous membrane of PLLA-PVA blend. *Journal of Applied Polymer Science*, 128, 2840-2846.
- Elshazly T (2004). *Characterization of PVA hidrogels with regards to vascular graft development*. MSc Thesis. Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA.
- Farber, A. & Major, K. (2004). Cryopreserved saphenous vein allografts in infrainguinal arterial reconstruction. *J Cardiovasc Surg (Torino.)*, 45, 213-216.

- Farber, A., Major, K., Wagner, W. H., Cohen, J. L., Cossman, D. V., Lauterbach, S. R. et al. (2003). Cryopreserved saphenous vein allografts in infrainguinal revascularization: analysis of 240 grafts. *J Vasc.Surg*, 38, 15-21.
- Fernandes, H. P., Cesar, C. L., & Barjas-Castro, M. d. L. (2011). Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 33, 297-301.
- Fernandes, J. C., Eaton, P., Nascimento, H., Belo, L. ü., Rocha, S., Vitorino, R. et al. (2008). Effects of Chitooligosaccharides on Human Red Blood Cell Morphology and Membrane Protein Structure. *Biomacromolecules*, 9, 3346-3352.
- Ferraresso, M., Bertoli, S., Nobili, P., & Bortolani, E. M. (2013). Early experience with a newly developed electrospun polycarbonate-urethane vascular graft for hemodialysis access. *J Vasc.Access.*, 14, 252-256.
- Fillinger, M. F., Reinitz, E. R., Schwartz, R. A., Resetarits, D. E., Paskanik, A. M., & Bredenberg, C. E. (1989). Beneficial effects of banding on venous intimal-medial hyperplasia in arteriovenous loop grafts. *Am J Surg*, 158, 87-94.
- FitzGerald, G. A., Pedersen, A. K., & Patrono, C. (1983). Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation*, 67, 1174-1177.
- Folkman, J. (1997). Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. In I.Goldberg & E. Rosen (Eds.), *Regulation of Angiogenesis* (79 ed., pp. 1-8). Birkhauser Basel.
- Folkman, J. & Hanahan, D. (1991). Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp.*, 22, 339-347.
- Foster, J. H., Killen, D. A., Jolly, P. C., & Kirtley, J. H. (1966). Low molecular weight dextran in vascular surgery: prevention of early thrombosis following arterial reconstruction in 85 cases. *Ann.Surg.*, 163, 764-770.
- Fowkes, F. G., Housley, E., Cawood, E. H., Macintyre, C. C., Ruckley, C. V., & Prescott, R. J. (1991). Edinburgh Artery Study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int.J Epidemiol.*, 20, 384-392.
- Franchini, K. G., Cestari, I. A., & Krieger, E. M. (1994). Restoration of arterial blood oxygen tension increases arterial pressure in sinoaortic-denervated rats. *Am.J Physiol.*, 266, H1055-H1061.

- Friedman, S. G., Lazzaro, R. S., Spier, L. N., Moccio, C., & Tortolani, A. J. (1995). A prospective randomized comparison of Dacron and polytetrafluoroethylene aortic bifurcation grafts. *Surgery*, 117, 7-10.
- Fu, K., Izquierdo, R., Walenga, J. M., & Fareed, J. (1995). Comparative study on the use of anticoagulants heparin and recombinant hirudin in a rabbit traumatic anastomosis model. *Thrombosis Research*, 78, 421-428.
- Gemmell, C. H., Nemerson, Y., & Turitto, V. (1990). The effects of shear rate on the enzymatic activity of the tissue factor-factor VIIa complex. *Microvasc.Res*, 40, 327-340.
- Gemmell, C. H., Yeo, E. L., & Sefton, M. V. (1997). Flow cytometric analysis of material-induced platelet activation in a canine model: Elevated microparticle levels and reduced platelet life span. *Journal of Biomedical Materials Research*, 37, 176-181.
- Ghanbari, H., de, M. A., & Seifalian, A. M. (2011). Cardiovascular application of polyhedral oligomeric silsesquioxane nanomaterials: a glimpse into prospective horizons. *Int.J Nanomedicine.*, 6, 775-786.
- Glickman, M. H., Stokes, G. K., Ross, J. R., Schuman, E. D., Sternbergh, W. C., III, Lindberg, J. S. et al. (2001). Multicenter evaluation of a polytetrafluoroethylene vascular access graft as compared with the expanded polytetrafluoroethylene vascular access graft in hemodialysis applications. *J Vasc.Surg*, 34, 465-472.
- Go, A. S., Mozaffarian, D., Roger, V. r. L., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B. et al. (2013). Heart Disease and Stroke StatisticsGÇö2013 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 127, e6-e245.
- Godo, M. N. & Sefton, M. V. (1999). Characterization of transient platelet contacts on a polyvinyl alcohol hydrogel by video microscopy. *Biomaterials*, 20, 1117-1126.
- Goldman, S., Zadina, K., Moritz, T., Ovitt, T., Sethi, G., Copeland, J. G. et al. (2004). Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: Results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 44, 2149-2156.
- Gong, Z. & Niklason, L. E. (2011). Use of human mesenchymal stem cells as alternative source of smooth muscle cells in vessel engineering. *Methods.Mol.Biol.*, 698, 279-294.

- Gonzalez, J. S., Luduena, L. N., Ponce, A., & Alvarez, V. A. (2014). Poly(vinylalcohol)/cellulose nanowhiskers nanocomposite hydrogels for potential wound dressings. *Mater.Sci.Eng C.Mater.Biol.Appl.*, 34, 54-61.
- Gorbet, M. B. & Sefton, M. V. (1-5-2001). Leukocyte activation and leukocyte procoagulant activities after blood contact with polystyrene and polyethylene glycol-immobilized polystyrene beads. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 137[5], 345-355.
- Gorbet, M. B. & Sefton, M. V. (2004a). Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, 25, 5681-5703.
- Gorbet, M. B. & Sefton, M. V. (2004b). Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, 25, 5681-5703.
- Grant, C., Twigg, P., Egan, A., Moody, A., Smith, A., Eagland, D. et al. (2006). Poly(vinyl alcohol) Hydrogel as a Biocompatible Viscoelastic Mimetic for Articular Cartilage. *Biotechnology Progress*, 22, 1400-1406.
- Grassl, E. D., Oegema, T. R., & Tranquillo, R. T. (2003). A fibrin-based arterial media equivalent. *J Biomed Mater.Res.A.*, 66, 550-561.
- Green, R. M., Abbott, W. M., Matsumoto, T., Wheeler, J. R., Miller, N., Veith, F. J. et al. (2000). Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: five-year results of a randomized trial. *J Vasc.Surg*, 31, 417-425.
- Greenhalgh, R. M., Brown, L. C., Kwong, G. P., Powell, J. T., & Thompson, S. G. (2004). Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day operative mortality results: randomised controlled trial. *Lancet.*, 364, 843-848.
- Greenwald, S. E., Moore, J. E., Jr., Rachev, A., Kane, T. P., & Meister, J. J. (1997). Experimental investigation of the distribution of residual strains in the artery wall. *J Biomech.Eng*, 119, 438-444.
- Groegler, F., Kapfer, X., & Meichelboeck, W. (2002). Does carbon improve PTFE bypass material. Proceedings of the 20th congress of the International Union of Angiology, New York. 6-12.

- Grunkemeier, J. M., Tsai, W. B., McFarland, C. D., & Horbett, T. A. (2000). The effect of adsorbed fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor and vitronectin on the procoagulant state of adherent platelets. *Biomaterials*, 21, 2243-2252.
- Gu, H., Chua, A., Tan, B. K., & Chew, H. K. (2006). Nonlinear finite element simulation to elucidate the efficacy of slit arteriotomy for end-to-side arterial anastomosis in microsurgery. *J.Biomech.*, 39, 435-443.
- Gulkarov, I., Malik, R., Yakubov, R., Gagne, P., Muhs, B. E., Rockman, C. et al. (2008). Early results for below-knee bypasses using Distaflo. *Vasc.Endovascular Surg*, 42, 561-566.
- Gunasekaran, G., Mosna, L. C., & Savino, J. A. (2013). Portomesenteric reconstruction using an umbilical vein patch during pancreaticoduodenectomy (Whipple procedure). *J Am.Coll.Surg*, 217, e9-11.
- Guowei, D., Adriane, K., Chen, X., Jie, C., & Yinfeng, L. (2007). PVP magnetic nanospheres: Biocompatibility, in vitro and in vivo bleomycin release. *International Journal of Pharmaceutics*, 328, 78-85.
- Gürhan Ulusoy, M., Kankaya, Y., Uysal, A., Sungur, N., Koter, U., Kankaya, D. et al. (2009). "Lid technique": cyanoacrylate-assisted anastomosis of small-sized vessels. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 62, 1205-1209.
- Hanna, E. S., Kabbani, S. S., Bashour, T. T., Crew, J. R., Ellertson, D. G., Alqaisi, M. et al. (1983). Internal mammary coronary artery bypass surgery: experience with 1000 cases. *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St.Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital*, 10, 131-135.
- Hanson, S. R. & Sakariassen, K. S. (1998). Blood flow and antithrombotic drug effects. *Am Heart J*, 135, S132-S145.
- Hanson, S. R. & Tucker, E. I. (2013). Chapter II.2.6 - Blood Coagulation and Blood-Materials Interactions. In D.R.Buddy, Allan S.Hoffman, J. S. a. J. Frederick, & Jack E.Lemons (Eds.), *Biomaterials Science (Third Edition)* (pp. 551-557). Academic Press.
- Harashina, T. (1977). Use of the united suture in microvascular anastomoses. *Plast.Reconstr.Surg*, 59, 134-135.

- Harker, L. A., Hanson, S. R., & Kelly, A. B. (1997). Antithrombotic strategies targeting thrombin activities, thrombin receptors and thrombin generation. *Thrombosis and haemostasis*, 78, 736-741.
- Hashi, C. K., Derugin, N., Janairo, R. R., Lee, R., Schultz, D., Lotz, J. et al. (2010). Antithrombogenic Modification of Small-Diameter Microfibrous Vascular Grafts. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30, 1621-1627.
- Hassan, C. & Peppas, N. (2000). Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. In *Biopolymers - PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites* (153 ed., pp. 37-65). Springer Berlin Heidelberg.
- Haverich, A., Maatz, W., Stegmann, T., Oelert, H., & Borst, H. G. (1986). Experimental and clinical experiences with double-velour woven Dacron prostheses. *Thorac Cardiovasc Surg*, 34, 52-53.
- Hawkins, J. A., Hillman, N. D., Lambert, L. M., Jones, J., Di Russo, G. B., Profaizer, T. et al. (1-7-2003). Immunogenicity of decellularized cryopreserved allografts in pediatric cardiac surgery: comparison with standard cryopreserved allografts. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 126[1], 247-252.
- Hawthorne, W. J., Ao, P. Y., Vicaretti, M., & Fletcher, J. P. (2002). New methodology for assessment of intimal hyperplasia of vascular prostheses. *ANZ.J Surg*, 72, 623-627.
- Hayhurst, J. W. & O'Brien, B. M. (1975). An experimental study of microvascular technique, patency rates and related factors. *Br.J Plast.Surg*, 28, 128-132.
- He, T., Smith, L. A., Harrington, S., Nath, K. A., Caplice, N. M., & Katusic, Z. S. (2004). Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries. *Stroke*, 35, 2378-2384.
- Hecker, M., Mulsch, A., Bassenge, E., & Busse, R. (1993). Vasoconstriction and increased flow: two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacoid release. *Am J Physiol*, 265, H828-H833.
- Hecker, M. (2000). Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, Fact or Fiction? *Physiology*, 15, 1-5.

- Heesch, C. M., Thames, M. D., & Abboud, F. M. (1984). Acute resetting of carotid sinus baroreceptors. I. Dissociation between discharge and wall changes. *Am.J Physiol.*, *247*, H824-H832.
- Heeschen, C., Aicher, A., Lehmann, R., Fichtlscherer, S., Vasa, M., Urbich, C. et al. (2003). Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*, *102*, 1340-1346.
- Heijnen, H. F. G., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J., & Sixma, J. J. (1999). Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Granules. *Blood*, *94*, 3791-3799.
- Heise, M., Schmidmaier, G., Husmann, I., Heidenhain, C., Schmidt, J., Neuhaus, P. et al. (2006). PEG-hirudin/iloprost Coating of Small Diameter ePTFE Grafts Effectively Prevents Pseudointima and Intimal Hyperplasia Development. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, *32*, 418-424.
- Henry, F. S., Collins, M. W., Hughes, P. E., & How, T. V. (1996). Numerical investigation of steady flow in proximal and distal end-to-side anastomoses. *J Biomech.Eng*, *118*, 302-310.
- Hess, F., Jerusalem, C., Steeghs, S., Reijnders, O., Braun, B., & Grande, P. (1992). Development and long-term fate of a cellular lining in fibrous polyurethane vascular prostheses implanted in the dog carotid and femoral artery. A scanning and light microscopical study up to 53 months after implantation. *J Cardiovasc Surg (Torino.)*, *33*, 358-365.
- Hills, A. J., Shalhoub, J., Shepherd, A. C., & Davies, A. H. (2009). Peripheral arterial disease. *Br.J Hosp.Med.(Lond)*, *70*, 560-565.
- Hirai, J. & Matsuda, T. (1995). Self-organized, tubular hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen for low-pressure-loaded venous system. *Cell Transplant.*, *4*, 597-608.
- Hiraizumi, Y., Transfeldt, E. E., Fujimaki, E., & Nambu, M. (1995). Application of polyvinyl alcohol hydrogel membrane as anti-adhesive interposition after spinal surgery. *Spine.(Phila Pa 1976.)*, *20*, 2272-2277.

Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkada, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R.G., Kobayashi, N., et al. (3-6-2010). Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing. *Cell Transplantation* 19[6], 667-679.

Hirsch, A. T., Haskal, Z. J., Hertzner, N. R., Bakal, C. W., Creager, M. A., Halperin, J. L. et al. (2006). ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation*, 113, e463-e654.

Hobson, R. W., Mackey, W. C., Ascher, E., Murad, M. H., Calligaro, K. D., Comerota, A. J. et al. (2008). Management of atherosclerotic carotid artery disease: clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 48, 480-486.

Hoffman, A., Ratner, B., Garfinkle, A., Reynolds, L., Horbett, T., & Hanson, S. (1987). The Smaller Diameter Vascular Graft - A Biomaterials Challenge. In E. Chiellini, P. Giusti, C. Migliaresi, & L. Nicolais (Eds.), *Polymers in Medicine II* (34 ed., pp. 157-173). Springer US.

Hoffmann, J., Groll, J., Heuts, J., Rong, H., Klee, D., Ziemer, G. et al. (2006). Blood cell and plasma protein repellent properties of star-PEG-modified surfaces. *J Biomater. Sci. Polym. Ed*, 17, 985-996.

Hoffmann, J., Paul, A., Harwardt, M., Groll, J., Reeswinkel, T., Klee, D. et al. (2008). Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for porcine endothelial precursor cells. *J Biomed Mater Res A*, 84, 614-621.

Hofstra, L., Bergmans, D. C., Leunissen, K. M., Hoeks, A. P., Kitslaar, P. J., Daemen, M. J. et al. (1995). Anastomotic intimal hyperplasia in prosthetic arteriovenous fistulas for hemodialysis is associated with initial high flow velocity and not with mismatch in elastic properties. *J Am Soc. Nephrol.*, 6, 1625-1633.

- Hong, J., Nilsson, E. K., Reynolds, H., Larsson, R., & Nilsson, B. (1999). A new in vitro model to study interaction between whole blood and biomaterials. Studies of platelet and coagulation activation and the effect of aspirin. *Biomaterials*, 20, 603-611.
- Horbett, T. A. (1993). Principles underlying the role of adsorbed plasma proteins in blood interactions with foreign materials. *Cardiovascular Pathology*, 2, 137-148.
- Hoshi, R. A., Van, L. R., Jen, M. C., Allen, J. B., Lapidos, K. A., & Ameer, G. (2013). The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts. *Biomaterials*, 34, 30-41.
- Hristov, M., Erl, W., & Weber, P. C. (2003). Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol*, 23, 1185-1189.
- Hsu GL & Hsieh CH (2003). End-to-end Anastomosis. In Hsu GL & Hsieh (Eds.), *A Laboratory Manual for Potency Microsurgery* (1st ed., pp. 17-20). Taipei: Taipei Medical University Hospital.
- Huynh, T., Abraham, G., Murray, J., Brockbank, K., Hagen, P. O., & Sullivan, S. (1999). Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. *Nat. Biotechnol.*, 17, 1083-1086.
- Hyon, S. H., Cha, W. I., Ikada, Y., Kita, M., Ogura, Y., & Honda, Y. (1994). Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 5[5], 397-406.
- Iba, T., Gando, S., Murata, A., Kushimoto, S., Saitoh, D., Eguchi, Y. et al. (2007). Predicting the Severity of Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)-Associated Coagulopathy With Hemostatic Molecular Markers and Vascular Endothelial Injury Markers. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 63.
- Imai, Y., Nolan, P. L., & Johnston, C. I. (1983). Endogenous vasopressin modulates the baroreflex sensitivity in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 10, 289-292.
- Inoue, Y., Sugano, N., Jibiki, M., Kudo, T., & Iwai, T. (2008). Effects of cilostazol and k-134 on reconstructive surgery using prosthetic grafts in the abdominal aorta of beagle dogs. *Thrombosis Research*, 123, 122-129.

- Irvine, L. I. N. D., Sundaram, S. U. M. U., Courtney, J. M., Taggart, D. P., Wheatley, D. J., & Lowe, G. D. O. (1991). Monitoring of Factor XII Activity and Granulocyte Elastase Release During Cardiopulmonary Bypass. *ASAIO Journal*, 37.
- Irwin, C., Roberts, W., & Naseem, K. M. (2009). Nitric oxide inhibits platelet adhesion to collagen through cGMP-dependent and independent mechanisms: the potential role for S-nitrosylation. *Platelets*, 20, 478-486.
- Isenberg, B. C., Williams, C., & Tranquillo, R. T. (2006). Small-Diameter Artificial Arteries Engineered In Vitro. *Circulation Research*, 98, 25-35.
- Ishii, Y., Sakamoto, S. i., Kronengold, R. T., Virmani, R., Rivera, E. A., Goldman, S. M. et al. (2008). A novel bioengineered small-caliber vascular graft incorporating heparin and sirolimus: Excellent 6-month patency. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 135, 1237-1246.
- ISO, (1994). Cardiovascular implants: tubular vascular prostheses. *ISO 7198-1*, 2:1994.
- Isselbacher, E. M. (2005). Thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Circulation*, 111, 816-828.
- Iwamoto, J., Yoshinaga, M., Yang, S. P., Krasney, E., & Krasney, J. (1992). Methylene blue inhibits hypoxic cerebral vasodilation in awake sheep. *J Appl.Physiol.(1985.)*, 73, 2226-2232.
- Izhar, U., Schwalb, H., Borman, J. B., Hellener, G. R., Hotoveli-Salomon, A., Marom, G. et al. (2001). Novel synthetic selectively degradable vascular prostheses: a preliminary implantation study. *J Surg Res.*, 95, 152-160.
- Jain, K. K. (1990). Microvascular anastomosis using the Nd:YAG laser. *Neurosurgery.*, 26, 892-893.
- Jeschke, M. G., Hermanutz, V., Wolf, S. E., & Koveker, G. B. (1999). Polyurethane vascular prostheses decreases neointimal formation compared with expanded polytetrafluoroethylene. *J Vasc.Surg*, 29, 168-176.
- Jin, J., Quinton, T. M., Zhang, J., Rittenhouse, S. E., & Kunapuli, S. P. (2002). Adenosine diphosphate (ADP)Gö-induced thromboxane A₂ generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin α IIb β 3 and ADP receptors. *Blood*, 99, 193-198.

- Jonas, R. A., Ziemer, G., Schoen, F. J., Britton, L., & Castaneda, A. R. (1988). A new sealant for knitted Dacron prostheses: minimally cross-linked gelatin. *J Vasc.Surg*, 7, 414-419.
- Jones, D. N., Rutherford, R. B., Ikezawa, T., Nishikimi, N., Ishibashi, H., & Whitehill, T. A. (1991). Factors affecting the patency of small-caliber prostheses: Observations in a suitable canine model. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 14, 441-448.
- Jordan, S. W. & Chaikof, E. L. (2007). Novel thromboresistant materials. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 45 Suppl A, A104-A115.
- Joshi, A., Fussell, G., Thomas, J., Hsuan, A., Lowman, A., Karduna, A. et al. (2006). Functional compressive mechanics of a PVA/PVP nucleus pulposus replacement. *Biomaterials*, 27, 176-184.
- Junqueira, L. C. U. & Carneiro, J. (2008). *Histologia básica: texto, atlas*. nona Ed. Guanabara Koogan.
- Kakisis, J. D., Liapis, C. D., Breuer, C., & Sumpio, B. E. (2005). Artificial blood vessel: The Holy Grail of peripheral vascular surgery. *Journal of Vascular Surgery*, 41, 349-354.
- Kakkos, S. K., Topalidis, D., Haddad, R., Haddad, G. K., & Shepard, A. D. (2011). Long-term complication and patency rates of Vectra and IMPRA Carboflo vascular access grafts with aggressive monitoring, surveillance and endovascular management. *Vascular*, 19, 21-28.
- Kalka, C., Takahashi, T., Masuda, H., Asahara, T., & Isner, J. M. (1999). [Vascular endothelial factor (VEGF): therapeutic angiogenesis and vasculogenesis in the treatment of cardiovascular disease]. *Med.Klin.(Munich)*, 94, 193-201.
- Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Butler, P. E., & Seifalian, A. M. (2005). Polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposites: the next generation material for biomedical applications. *Acc.Chem.Res*, 38, 879-884.
- Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Butler, P. E., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2005). Current status of prosthetic bypass grafts: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 74B, 570-581.

Kapfer, X., Meichelboeck, W., & Groegler, F. M. (1-8-2006). Comparison of Carbon-impregnated and Standard ePTFE Prostheses in Extra-anatomical Anterior Tibial Artery Bypass: A Prospective Randomized Multicenter Study. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 32[2], 155-168.

Kaplan, M. & Baysal, K. (2005). In vitro toxicity test of ethyl 2-cyanoacrylate, a tissue adhesive used in cardiovascular surgery, by fibroblast cell culture method. *Heart Surg.Forum.*, 8, E169-E172.

Kaplan, M., Bozkurt, S., Kut, M. S., Kullu, S., & Demirtas, M. M. (2004). Histopathological effects of ethyl 2-cyanoacrylate tissue adhesive following surgical application: an experimental study. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.*, 25, 167-172.

Kaplan, M., Oral, B., Rollas, S., Kut, M. S., & Demirtas, M. M. (2004). Absorption of ethyl 2-cyanoacrylate tissue adhesive. *Eur.J.Drug Metab.Pharmacokinet.*, 29, 77-81.

Karamursel, S., Kayikcioglu, A., Ertoy, D., Karamursel, B., Dayican, A., Celebioglu, S. et al. (2001). Long-term effects of extraluminal dilatation with a rigid circle on arteriovenous anastomotic line in venous grafts transposed into arterial defects. *Ann.Plast.Surg.*, 47, 279-284.

Karges, H. E., Funk, K. A., & Ronneberger, H. (1994). Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. *Arzneimittelforschung.*, 44, 793-797.

Khaladj, N., Pichlmaier, U., Stachmann, A., Peterss, S., Reichelt, A., Hagl, C. et al. (2013). Cryopreserved human allografts (homografts) for the management of graft infections in the ascending aortic position extending to the arch. *Eur.J Cardiothorac.Surg*, 43, 1170-1175.

Khodadadi, J., Golcman, L., & Milleritzky, M. (1980). Vascular trauma: Successful repair using human umbilical cord vein interposition grafts in femoral artery and vein. *Injury*, 12, 45-47.

Khoo, J. C., Miller, E., McLoughlin, P., & Steinberg, D. (1988). Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis*, 8, 348-358.

Khoo, J. C., Miller, E., Pio, F., Steinberg, D., & Witztum, J. L. (1992). Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates. *Arterioscler.Thromb.*, 12, 1258-1266.

- Kibbe, M. R., Martinez, J., Popowich, D. A., Kapadia, M. R., Ahanchi, S. S., Aalami, O. O. et al. (2010). Citric acid-based elastomers provide a biocompatible interface for vascular grafts. *J Biomed Mater Res A*, 93, 314-324.
- Kingston, G. T., Darby, C. R., & Roberts, I. S. (2009). The pathology of depopulated bovine ureter xenografts utilized for vascular access in haemodialysis patients. *Histopathology*, 55, 154-160.
- Klement, P., Du, Y. J., Berry, L., Andrew, M., & Chan, A. K. C. (2002). Blood-compatible biomaterials by surface coating with a novel antithrombinGÇôheparin covalent complex. *Biomaterials*, 23, 527-535.
- Klinkert, P., Post, P. N., Breslau, P. J., & van Bockel, J. H. (2004). Saphenous Vein Versus PTFE for Above-Knee Femoropopliteal Bypass. A Review of the Literature. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 27, 357-362.
- Kobayashi, M., Chang, Y. S., & Oka, M. (2005). A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials*, 26, 3243-3248.
- Kobayashi, M., Toguchida, J., & Oka, M. (2001). Development of the shields for tendon injury repair using polyvinyl alcohol GÇô hydrogel (PVA-H). *Journal of Biomedical Materials Research*, 58, 344-351.
- Koh, C. J. & Atala, A. (2005). Tissue Engineering, Stem Cells, and Cloning: Current Concepts and Future Trends. In A.Keating, K. Dicke, N. Gorin, R. Weber, & H. Graf (Eds.), *Regenerative and Cell Therapy* (11 ed., pp. 35-67). Springer Berlin Heidelberg.
- Kohler, T. R. & Kirkman, T. R. (1999). Dialysis access failure: A sheep model of rapid stenosis. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 30, 744-751.
- Kokabi, M., Sirousazar, M., & Hassan, Z. M. (2007). PVA-clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *European Polymer Journal*, 43, 773-781.
- Konig, G., McAllister, T. N., Dusserre, N., Garrido, S. A., Iyican, C., Marini, A. et al. (2009). Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials.*, 30, 1542-1550.

- Kovalic, A. J., Beattie, D. K., & Davies, A. H. (2002). Outcome of ProCol, a bovine mesenteric vein graft, in infrainguinal reconstruction. *Eur.J Vasc.Endovasc.Surg.*, 24, 533-534.
- Kraiss, L. W. & Clowes, A. W. (1997). Responses of the arterial wall to injury and intimal hyperplasia. In Sidawy AN, B. E. Sumpio, & A. N. DePalma RG (Eds.), *The Basic Science of Vascular Disease* (pp. 289-317). Futura Publishing Company Inc.
- Krötz, F., Riexinger, T., Buerkle, M. A., Nithipatikom, K., Gloe, T., Sohn, H. Y. et al. (2004). Membrane Potential-Dependent Inhibition of Platelet Adhesion to Endothelial Cells by Epoxyeicosatrienoic Acids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24, 595-600.
- L'Heureux, N., Germain, L., Labbe, R., & Auger, F. A. (1993). In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. *J Vasc.Surg*, 17, 499-509.
- L'Heureux, N., Stoclet, J. C., Auger, F. A., Lagaud, G. J., Germain, L., & Andriantsitohaina, R. (2001). A human tissue-engineered vascular media: a new model for pharmacological studies of contractile responses. *FASEB J*, 15, 515-524.
- L'Heureux, N., Dusserre, N., Konig, G., Victor, B., Keire, P., Wight, T. N. et al. (2006). Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med*, 12, 361-365.
- L'Heureux, N., Dusserre, N., Marini, A., Garrido, S., de la Fuente, L., & McAllister, T. (2007). Technology Insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts[mdash]from research to clinical practice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 4, 389-395.
- L'Heureux, N., McAllister, T. N., & de la Fuente, L. M. (2007). Tissue-Engineered Blood Vessel for Adult Arterial Revascularization. *New England Journal of Medicine*, 357, 1451-1453.
- L'Heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L., & Auger, F. A. (1998). A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *The FASEB Journal*, 12, 47-56.
- Lamponi, S., Leone, G., Consumi, M., Greco, G., & Magnani, A. (2012). In Vitro Biocompatibility of New PVA-Based Hydrogels as Vitreous Body Substitutes. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23, 555-575.

- Langham, R. G. & Kelly, D. J. (2013). Urotensin II and the kidney. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.*, 22, 107-112.
- Lantz, G. C., Badylak, S. F., Coffey, A. C., Geddes, L. A., & Sandusky, G. E. (1992). Small intestinal submucosa as a superior vena cava graft in the dog. *J Surg Res.*, 53, 175-181.
- Lantz, G. C., Badylak, S. F., Hiles, M. C., Coffey, A. C., Geddes, L. A., Kokini, K. et al. (1993). Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review. *J Invest.Surg*, 6, 297-310.
- Laredo, J., Xue, L., Husak, V. A., Ellinger, J., & Greisler, H. P. (2003). Silyl-heparin adsorption improves the in vivo thromboresistance of carbon-coated polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Am J Surg*, 186, 556-560.
- Larsen, B. T., Miura, H., Hatoum, O. A., Campbell, W. B., Hammock, B. D., Zeldin, D. C. et al. (2006). Epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids dilate human coronary arterioles via BK(Ca) channels: implications for soluble epoxide hydrolase inhibition. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 290, H491-H499.
- Lauritzen, C. (1978). A new and easier way to anastomose microvessels. An experimental study in rats. *Scand.J.Plast.Reconstr.Surg.*, 12, 291-294.
- Le, B. A., Gauberti, M., Martinez de, L. S., Montagne, A., Lemarchand, E., Repesse, Y. et al. (2014). GpIbalpha-VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice. *Blood*.
- Lederle, F. A., Johnson, G. R., & Wilson, S. E. (2001). Abdominal aortic aneurysm in women. *J.Vasc.Surg.*, 34, 122-126.
- Lee, K. W., Stolz, D. B., & Wang, Y. (2011). Substantial expression of mature elastin in arterial constructs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 108, 2705-2710.
- Lee, S. & Lee, R. T. (2010). Mechanical Stretch and Intimal Hyperplasia: The Missing Link? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30, 459-460.
- Lei, M., Archie, J. P., & Kleinstreuer, C. (1997). Computational design of a bypass graft that minimizes wall shear stress gradients in the region of the distal anastomosis. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 25, 637-646.

- Leitão, A. F., Gupta, S., Silva, J. P., Reviakine, I., & Gama, M. (2013). Hemocompatibility study of a bacterial cellulose/polyvinyl alcohol nanocomposite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 493-502.
- Lemson, M. S., Tordoir, J. H., Daemen, M. J., & Kitslaar, P. J. (2000). Intimal hyperplasia in vascular grafts. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, 19, 336-350.
- Leone, A. M., Valgimigli, M., Giannico, M. B., Zaccone, V., Perfetti, M., D'Amario, D. et al. (2009). From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *European Heart Journal*, 30, 890-899.
- Leonsins, A. J. (1952). Dextran; a valuable plasma volume expander. *S.Afr.Med.J.*, 26, 546-549.
- Leppaniemi, A., Rich, N., Pikoulis, E., Rhee, P., Burris, D., & Wherry, D. (2000). Sutureless vascular reconstruction with titanium clips. *Int.Angiol.*, 19, 69-74.
- Lesèche, G., Castier, Y., Petit, M. D., Bertrand, P., Kitzis, M., Mussot, S. et al. (2001). Long-term results of cryopreserved arterial allograft reconstruction in infected prosthetic grafts and mycotic aneurysms of the abdominal aorta. *Journal of Vascular Surgery*, 34, 616-622.
- Li, B., Sharpe, E. E., Maupin, A. B., Teleron, A. A., Pyle, A. L., Carmeliet, P. et al. (2006). VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J*, 20, 1495-1497.
- Li, H., Chen, C., Zhang, S., Jiang, J., Tao, H., Xu, J. et al. (2012). The use of layer by layer self-assembled coatings of hyaluronic acid and cationized gelatin to improve the biocompatibility of poly(ethylene terephthalate) artificial ligaments for reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Acta Biomaterialia*, 8, 4007-4019.
- Li, S. & Henry, J. J. (2011). Nonthrombogenic approaches to cardiovascular bioengineering. *Annu.Rev.Biomed Eng.*, 13, 451-475.
- Li, S., Sengupta, D., & Chien, S. (2014). Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *Wiley.Interdiscip.Rev.Syst.Biol.Med*, 6, 61-76.

- Lin, P. H., Bush, R. L., Yao, Q., Lumsden, A. B., & Chen, C. (2004). Evaluation of platelet deposition and neointimal hyperplasia of heparin-coated small-caliber ePTFE grafts in a canine femoral artery bypass model. *Journal of Surgical Research*, 118, 45-52.
- Lin, P. H., Chen, C., Bush, R. L., Yao, Q., Lumsden, A. B., & Hanson, S. R. (2004). Small-caliber heparin-coated ePTFE grafts reduce platelet deposition and neointimal hyperplasia in a baboon model. *Journal of Vascular Surgery*, 39, 1322-1328.
- Liu, Y., Vrana, N. E., Cahill, P. A., & McGuinness, G. B. (2009a). Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: Structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 90B, 492-502.
- Liu, Y., Vrana, N. E., Cahill, P. A., & McGuinness, G. B. (2009b). Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: Structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 90B, 492-502.
- Llanos, G. R. & Sefton, M. V. (1993a). Immobilization of poly(ethylene glycol) onto a poly(vinyl alcohol) hydrogel: 2. Evaluation of thrombogenicity. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27, 1383-1391.
- Llanos, G. R. & Sefton, M. V. (1993b). Immobilization of poly(ethylene glycol) onto a poly(vinyl alcohol) hydrogel: 2. Evaluation of thrombogenicity. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27, 1383-1391.
- Longchamp, A., Alonso, F., Dubuis, C. +., Allagnat, F., Berard, X., Meda, P. et al. (2014). The use of external mesh reinforcement to reduce intimal hyperplasia and preserve the structure of human saphenous veins. *Biomaterials*, 35, 2588-2599.
- Lord, M. S., Cheng, B., McCarthy, S. J., Jung, M., & Whitelock, J. M. (2011). The modulation of platelet adhesion and activation by chitosan through plasma and extracellular matrix proteins. *Biomaterials*, 32, 6655-6662.
- Lorentzen, J. E., Nielsen, O. M., Arendrup, H., Kimose, H. H., Bille, S., Andersen, J. et al. (1985). Vascular graft infection: an analysis of sixty-two graft infections in 2411 consecutively implanted synthetic vascular grafts. *Surgery*, 98, 81-86.

- Luis, A. L., Rodrigues, J. M., Geuna, S., Amado, S., Shirosaki, Y., Lee, J. M. et al. (2008a). Use of PLGA 90:10 scaffolds enriched with in vitro-differentiated neural cells for repairing rat sciatic nerve defects. *Tissue.Eng.Part.A.*, 14, 979-993.
- Luis, A. L., Rodrigues, J. M., Geuna, S., Amado, S., Simões, M. J., Fregnan, F. et al. (2008b). Neural cell transplantation effects on sciatic nerve regeneration after a standardized crush injury in the rat. *Microsurgery.*, 28, 458-470.
- Lumsden, A. B. & Heyman, E. R. (2006). Prospective randomized study evaluating an absorbable cyanoacrylate for use in vascular reconstructions. *Journal of Vascular Surgery*, 44, 1002-1009.
- Lundell, A., Bergqvist, D., & Lindblad, B. (1993). The uptake of platelets, fibrinogen and leucocytes in ePTFE vascular grafts in relation to blood flow--an experimental study in sheep. *Eur.J Vasc Surg*, 7, 698-703.
- Lüscher, T. F., Richard, V., Tschudi, M., Yang, Z., & Boulanger, C. (1990). Endothelial control of vascular tone in large and small coronary arteries. *Journal of the American College of Cardiology*, 15, 519-527.
- Lytle, B. W. (2004). Prolonging patency--choosing coronary bypass grafts. *N.Engl.J.Med.*, 351, 2262-2264.
- MacDonald, J. D. (2005). Learning to perform microvascular anastomosis. *Skull.Base.*, 15, 229-240.
- Madden, R. L., Lipkowitz, G. S., Browne, B. J., & Kurbanov, A. (2005). A comparison of cryopreserved vein allografts and prosthetic grafts for hemodialysis access. *Ann.Vasc.Surg*, 19, 686-691.
- Maguire, J. J. & Davenport, A. P. (2002). Is urotensin-II the new endothelin? *British Journal of Pharmacology*, 137, 579-588.
- Mamode, N. & Scott, R. N. (2000). Graft type for femoro-popliteal bypass surgery. *Cochrane.Database.Syst.Rev.*, CD001487.
- Mangiapia, G., Ricciardi, R., Auriemma, F., Rosa, C. D., Celso, F. L., Triolo, R. et al. (2007). Mesoscopic and microscopic investigation on poly(vinyl alcohol) hydrogels in the presence of sodium decylsulfate. *J.Phys.Chem.B.*, 111, 2166-2173.

- Marcilli, R. & de Oliveira, M. G. Nitric oxide-releasing poly(vinyl alcohol) film for increasing dermal vasodilation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.
- Marois, Y., Paris, E., Zhang, Z., Doillon, C. J., King, M. W., & Guidoin, R. G. (1996). Vascugraft microporous polyesterurethane arterial prosthesis as a thoraco-abdominal bypass in dogs. *Biomaterials.*, 17, 1289-1300.
- Martino, S., D'Angelo, F., Armentano, I., Kenny, J. M., & Orlacchio, A. (2012). Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnology Advances*, 30, 338-351.
- Mathews, D. T., Birney, Y. A., Cahill, P. A., & McGuinness, G. B. (2008). Vascular cell viability on polyvinyl alcohol hydrogels modified with water-soluble and -insoluble chitosan. *J.Biomed Mater.Res.B.Appl.Biomater.*, 84, 531-540.
- Matsumoto, H., Hasegawa, T., Fuse, K., Yamamoto, M., & Saigusa, M. (1973). A new vascular prosthesis for a small caliber artery. *Surgery*, 74, 519-523.
- Matsuura, J. H., Black, K. S., Levitt, A. B., Rosenthal, D., Wellons, E. D., Fallon, M. T. et al. (2004). Cellular remodeling of depopulated bovine ureter used as an arteriovenous graft in the canine model. *J Am.Coll.Surg.*, 198, 778-783.
- McAllister, T. N., Maruszewski, M., Garrido, S. A., Wystrychowski, W., Dusserre, N., Marini, A. et al. (2009). Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet.*, 373, 1440-1446.
- McPhee, J. T., Hill, J. S., & Eslami, M. H. (2007). The impact of gender on presentation, therapy, and mortality of abdominal aortic aneurysm in the United States, 2001-2004. *J.Vasc.Surg.*, 45, 891-899.
- Mehta, S. (1991). Statistical summary of clinical results of vascular access procedures for hemodialysis. In Sommer BG & Henry ML (Eds.), *Vascular Access for Hemodialysis* (pp. 145-147). Chicago: W.L. Gore & Associates, Inc. and Precept Press.
- Meinhart, J., Deutsch, M., & ZILLA, P. (1997). Eight Years of Clinical Endothelial Cell Transplantation Closing the Gap Between Prosthetic Grafts and Vein Grafts. *ASAIO Journal*, 43.
- Melder, R. J., Munn, L. L., Yamada, S., Ohkubo, C., & Jain, R. K. (1995). Selectin- and integrin-mediated T-lymphocyte rolling and arrest on TNF-alpha-activated endothelium: augmentation by erythrocytes. *Biophys.J*, 69, 2131-2138.

- Melder, R. J., Yuan, J., Munn, L. L., & Jain, R. K. (2000). Erythrocytes enhance lymphocyte rolling and arrest in vivo. *Microvasc.Res*, 59, 316-322.
- Mendelson, K., Aikawa, E., Mettler, B. A., Sales, V., Martin, D., Mayer, J. E. et al. (2007). Healing and remodeling of bioengineered pulmonary artery patches implanted in sheep. *Cardiovasc Pathol*, 16, 277-282.
- Messina, E. J., Rodenburg, J., & Kaley, G. (1989). Microvascular effects of endothelin-1. *Microcirc.Endothelium.Lymphatics.*, 5, 505-518.
- Mettler, B. A., Sales, V. L., Stucken, C. L., Anttila, V., Mendelson, K., Bischoff, J. et al. (2008). Stem cell-derived, tissue-engineered pulmonary artery augmentation patches in vivo. *Ann.Thorac Surg*, 86, 132-140.
- Mia, G. V. & McKinsey, J. F. (2008). Use and abuse of atherectomy: where should it be used? *Semin.Vasc Surg*, 21, 204-209.
- Midwall, S., Swaminathan, R. V., Charitakis, K., Kim, L. K., Gordin, J., Hriljac, I. et al. (2013). Impact of peripheral vascular disease on short- and long-term outcomes in patients undergoing non-emergent percutaneous coronary intervention in the drug-eluting stent era. *J Invasive.Cardiol.*, 25, 132-136.
- Miller, D. C., Haberstroh, K. M., & Webster, T. J. (2007). PLGA nanometer surface features manipulate fibronectin interactions for improved vascular cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 81A, 678-684.
- Minnema, M. C., ten Cate, H., & Hack, C. E. (1999). The Role of Factor XI in Coagulation: A Matter of Revision. *Semin Thromb Hemost*, 25, 419-428.
- Mirensky, T. L., Nelson, G. N., Brennan, M. P., Roh, J. D., Hibino, N., Yi, T. et al. (2009). Tissue-engineered arterial grafts: long-term results after implantation in a small animal model. *J Pediatr.Surg*, 44, 1127-1132.
- Mitchell MB, Rutherford RB, & Krupski WC (1995). Infrarenal aortic aneurysms. In Rutherford RB (Ed.), *Vascular Surgery* (pp. 1032-1048). Philadelphia: WB Saunders.
- Mitchell, S. L. & Niklason, L. E. (2003). Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovasc Pathol*, 12, 59-64.

- Miyawaki, F., How, T. V., & Annis, D. (1990). Effect of compliance mismatch on flow disturbances in a model of an arterial graft replacement. *Med.Biol.Eng.Comput.*, 28, 457-464.
- Mooney, D. J., Mazzoni, C. L., Breuer, C., McNamara, K., Hern, D., Vacanti, J. P. et al. (1996). Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering. *Biomaterials.*, 17, 115-124.
- Morinaga, K., Okadome, K., Kuroki, M., Miyazaki, T., Muto, Y., & Inokuchi, K. (1985). Effect of wall shear stress on intimal thickening of arterially transplanted autogenous veins in dogs. *Journal of Vascular Surgery*, 2, 430-433.
- Motlagh, D., Yang, J., Lui, K. Y., Webb, A. R., & Ameer, G. A. (2006). Hemocompatibility evaluation of poly(glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 27, 4315-4324.
- Mueller RV, Arora B, Dry GM, & Vedder NB (2006). General Approach to Microsurgery. In S.E.Greer, P. Benhaim, M. T. Longaker, H. P. Lorenz, J. Chang, & M. H. Hedrick (Eds.), *Handbook of Plastic Surgery* (6th ed., pp. 505-554). Taylor & Francis.
- Mulzer, S. R. & Brash, J. L. (1989). Identification of plasma proteins adsorbed to hemodialyzers during clinical use. *J Biomed Mater Res*, 23, 1483-1504.
- Muto, A., Nishibe, T., Dardik, H., & Dardik, A. (2009). Patches for carotid artery endarterectomy: current materials and prospects. *J Vasc.Surg*, 50, 206-213.
- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S. W., Litovsky, S., Rumberger, J. et al. (2003a). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation*, 108, 1772-1778.
- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S. W., Litovsky, S., Rumberger, J. et al. (2003b). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*, 108, 1664-1672.
- Nam, D. A., Roberts, T. L., III, & Acland, R. D. (1978). An experimental study of end-to-side microvascular anastomosis. *Surg.Gynecol.Obstet.*, 147, 339-342.
- Nanjo, H., Sho, E., Komatsu, M., Sho, M., Zarins, C. K., & Masuda, H. (2006). Intermittent short-duration exposure to low wall shear stress induces intimal thickening in arteries exposed to chronic high shear stress. *Experimental and Molecular Pathology*, 80, 38-45.

- Naoum, J. J. & Arbid, E. J. (2012). Bypass surgery in limb salvage: polytetrafluoroethylene prosthetic bypass. *Methodist.Debakey.Cardiovasc J*, 8, 43-46.
- Napoli, C. & Ignarro, L. J. (2003). Nitric oxide-releasing drugs. *Annu.Rev Pharmacol.Toxicol.*, 43, 97-123.
- Nunes, N. (2012). *Modified PVA for vascular grafts*. Tese de Mestrado. FEUP- Universidade do Porto, Porto.
- Navab, M., Fogelman, A. M., Berliner, J. A., Territo, M. C., Demer, L. L., Frank, J. S. et al. (1995). Pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol.*, 76, 18C-23C.
- Nazzal, M., Owunwanne, A., & Christenson, J. T. (1991). Direct platelet effect of low molecular weight dextran in small calibre PTFE grafts. *European Journal of Vascular Surgery*, 5, 169-172.
- Nerem, R. M. & Ensley, A. E. (2004). The tissue engineering of blood vessels and the heart. *Am.J Transplant.*, 4 Suppl 6, 36-42.
- Neu, B., Wenby, R., & Meiselman, H. J. (15-9-2008). Effects of Dextran Molecular Weight on Red Blood Cell Aggregation. *Biophysical journal* 95[6], 3059-3065.
- Neufang, A., Espinola-Klein, C., Dorweiler, B., Messow, C. M., Schmiedt, W., & Vahl, C. F. (2007a). Femoropopliteal prosthetic bypass with glutaraldehyde stabilized human umbilical vein (HUV). *J Vasc.Surg*, 46, 280-288.
- Neufang, A., Espinola-Klein, C., Dorweiler, B., Savvidis, S., Schmiedt, W., & Vahl, C. F. (2007b). Infrapopliteal Composite Bypass with Autologous Vein and Second Generation Glutaraldehyde Stabilized Human Umbilical Vein (HUV) for Critical Lower Limb Ischaemia. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 34, 583-589.
- Nevelsteen, A., D'Hallewin, M. A., Deleersnijder, J., Wouters, L., & Suy, R. (1986). The Human Umbilical Vein Graft in Below-Knee Femoropopliteal and Femorotibial Surgery: an Eight Year Experience. *Annals of Vascular Surgery*, 1, 328-334.
- Niklason, L. E. (1999). Techview: medical technology. Replacement arteries made to order. *Science.*, 286, 1493-1494.
- Niklason, L. E., Gao, J., Abbott, W. M., Hirschi, K. K., Houser, S., Marini, R. et al. (1999). Functional arteries grown in vitro. *Science.*, 284, 489-493.

- Nimjee, S. M., Rusconi, C. P., & Sullenger, B. A. (2005). Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu.Rev Med.*, 56, 555-583.
- Node, K., Huo, Y., Ruan, X., Yang, B., Spiecker, M., Ley, K. et al. (1999). Anti-inflammatory Properties of Cytochrome P450 Epoxygenase-Derived Eicosanoids. *Science*, 285, 1276-1279.
- Noguchi, T., Yamamuro, T., Oka, M., Kumar, P., Kotoura, Y., Hyonyt, S. H. et al. (1991). Poly(vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage: Evaluation of biocompatibility. *Journal of Applied Biomaterials*, 2, 101-107.
- Nomi, M., Atala, A., Coppi, P. D., & Soker, S. (2002). Principals of neovascularization for tissue engineering. *Molecular Aspects of Medicine*, 23, 463-483.
- Norgren, L., Hiatt, W. R., Dormandy, J. A., Nehler, M. R., Harris, K. A., & Fowkes, F. G. (2007). Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 45 Suppl S, S5-67.
- Ombrellaro, M. P., Stevens, S. L., Sciarrotta, J., Freeman, M. B., & Goldman, M. H. (1996). Effect of endoluminal PTFE graft placement on cell proliferation, PDGF secretion, and intimal hyperplasia. *The Journal of surgical research*, 63, 110-114.
- Opitz, F., Schenke-Layland, K., Cohnert, T. U., Starcher, B., Halbhuber, K. J., Martin, D. P. et al. (2004). Tissue engineering of aortic tissue: dire consequence of suboptimal elastic fiber synthesis in vivo. *Cardiovascular Research*, 63, 719-730.
- Orban, J. M., Wilson, L. B., Kofroth, J. A., El-Kurdi, M. S., Maul, T. M., & Vorp, D. A. (2004). Crosslinking of collagen gels by transglutaminase. *J Biomed Mater.Res.A.*, 68, 756-762.
- Ouriel, K., Green, R. M., Donayre, C., Shortell, C. K., Elliott, J., & DeWeese, J. A. (1992). An evaluation of new methods of expressing aortic aneurysm size: relationship to rupture. *J.Vasc.Surg.*, 15, 12-18.
- Padalino, M. A., Castellani, C., Dedja, A., Fedrigo, M., Vida, V. L., Thiene, G. et al. (2012). Extracellular matrix graft for vascular reconstructive surgery: evidence of autologous regeneration of the neo-aorta in a murine model. *Eur.J Cardiothorac.Surg*, 42, e128-e135.

- Padalino, M. A., Vida, V. L., & Stellin, G. (2009). Transatrial-transpulmonary repair of tetralogy of Fallot. *Semin. Thorac Cardiovasc Surg Pediatr. Card Surg Annu.*, 48-53.
- Panza, J. A., Casino, P. R., Kilcoyne, C. M., & Quyyumi, A. A. (1993). Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*, 87, 1468-1474.
- Park, S. G., Kim, S. C., Choi, M. J., Lee, H. S., Min, B. G., Cheong, J. et al. (2003). Heparin monitoring in sheep by activated partial thromboplastin time. *Artif. Organs*, 27, 576-580.
- Patel, S., Kasoju, N., Bora, U., & Goyal, A. (2010). Structural analysis and biomedical applications of dextran produced by a new isolate *Pediococcus pentosaceus* screened from biodiversity hot spot Assam. *Bioresour. Technol.*, 101, 6852-6855.
- Paul, B. Z., Jin, J., & Kunapuli, S. P. (1999). Molecular Mechanism of Thromboxane A₂-induced Platelet Aggregation: Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 29108-29114.
- Pavcnik, D., Obermiller, J., Uchida, B., Van Alstine, W., Edwards, J., Landry, G. et al. (2009). Angiographic Evaluation of Carotid Artery Grafting with Prefabricated Small-Diameter, Small-Intestinal Submucosa Grafts in Sheep. *CardioVascular and Interventional Radiology*, 32, 106-113.
- Pearl, R. M., Wustrack, K. O., Harbury, C., Rubenstein, E., & Kaplan, E. N. (1977). Microvascular anastomosis using a blood product sealant-adhesive. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 144, 227-231.
- Pearson, D., Shively, J. E., Clark, B. R., Geschwind, I. I., Barkley, M., Nishioka, R. S. et al. (1980). Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77, 5021-5024.
- Peerschke, E. I. & Ghebrehiwet, B. (1998). Platelet receptors for the complement component C1q: implications for hemostasis and thrombosis. *Immunobiology*, 199, 239-249.
- Peeters, P., Verbist, J., Deloose, K., & Bosiers, M. (2006). Results with heparin bonded polytetrafluoroethylene grafts for femorodistal bypasses. *J Cardiovasc Surg (Torino.)*, 47, 407-413.

- Peirovi, H., Farnia, P., Bahrami, A., Mohsenifar, Z., Kashani, B. S., & Ghanavi, J. E. (2005). Modified Sleeve Anastomosis in Large Muscular Arteries of Sheep. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 30, 381-385.
- Pektok, E., Nottelet, B., Tille, J. C., Gurny, R., Kalangos, A., Moeller, M. et al. (2008). Degradation and Healing Characteristics of Small-Diameter Poly(epsilon-Caprolactone) Vascular Grafts in the Rat Systemic Arterial Circulation. *Circulation*, 118, 2563-2570.
- Persson, P. B., Ehmke, H., Nafz, B., & Kirchheim, H. R. (1990). Sympathetic modulation of renal autoregulation by carotid occlusion in conscious dogs. *Am.J Physiol.*, 258, F364-F370.
- Petersen, J. S., Hinojosa-Laborde, C., & DiBona, G. F. (1993). Sympathoinhibitory responses to 2-methylserotonin during changes in sodium intake. *Hypertension.*, 21, 1000-1004.
- Pierce, W. S., Turner, M. C., Jr., Boretos, J. W., Nolan, S. P., & Morrow, A. G. (1969). The development and experimental evaluation of an implantable left ventricular bypass pump. *Surgery*, 66, 1034-1043.
- Pislaru, S. V., Harbuzariu, A., Agarwal, G., Witt, T., Gulati, R., Sandhu, N. P. et al. (2006). Magnetic forces enable rapid endothelialization of synthetic vascular grafts. *Circulation*, 114, I314-I318.
- Pitt, T. T. & Humphries, N. L. (1982). Microarterial anastomoses in the rat: the influence of different suture materials on the patency, strength and the electron microscopic appearance of the vessels. *Br.J.Plast.Surg.*, 35, 150-155.
- Polterauer, P., Prager, M., Holzenbein, T., Karner, J., Kretschmer, G., & Schemper, M. (1992). Dacron versus polytetrafluoroethylene for Y-aortic bifurcation grafts: a six-year prospective, randomized trial. *Surgery*, 111, 626-633.
- Porter, J. G., Catalano, R., McEnroe, G., Lewicki, J. A., & Protter, A. A. (1992). C-type natriuretic peptide inhibits growth factor-dependent DNA synthesis in smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 263, C1001-C1006.
- Post, S., Kraus, T., Muller-Reinartz, U., Weiss, C., Kortmann, H., Quentmeier, A. et al. (2001). Dacron vs. polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass: a prospective randomised multicentre trial. *Eur.J Vasc.Endovasc.Surg*, 22, 226-231.

- Prager, M., Polterauer, P., Bohmig, H. J., Wagner, O., Fugl, A., Kretschmer, G. et al. (2001). Collagen versus gelatin-coated Dacron versus stretch polytetrafluoroethylene in abdominal aortic bifurcation graft surgery: results of a seven-year prospective, randomized multicenter trial. *Surgery*, 130, 408-414.
- Prinssen, M., Verhoeven, E. L., Buth, J., Cuypers, P. W., van Sambeek, M. R., Balm, R. et al. (2004). A randomized trial comparing conventional and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *N.Engl.J.Med.*, 351, 1607-1618.
- Qu, D., Li, J., Li, Y., Khadka, A., Zuo, Y., Wang, H. et al. (2011). Ectopic osteochondral formation of biomimetic porous PVA-n-HA/PA6 bilayered scaffold and BMSCs construct in rabbit. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 96B, 9-15.
- Quigley, M. R., Bailes, J. E., Kwaan, H. C., Cerullo, L. J., & Block, S. (1986). Comparison of myointimal hyperplasia in laser-assisted and suture anastomosed arteries. A preliminary report. *J.Vasc.Surg.*, 4, 217-219.
- Rafii, S. & Lyden, D. (2003). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat.Med.*, 9, 702-712.
- Ramos-Vara, J. A., Kiupel, M., Baszler, T., Bliven, L., Brodersen, B., Chelack, B. et al. (2008). Suggested Guidelines for Immunohistochemical Techniques in Veterinary Diagnostic Laboratories. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 393-413.
- Rao, V., Thomas, C. Y., & Jr. (1970). A technique for end-to-side vascular anastomosis. *Archives of Surgery*, 101, 91.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, 671-674.
- Roberts, W., Riba, R., Homer-Vanniasinkam, S., Farndale, R. W., & Naseem, K. M. (2008). Nitric oxide specifically inhibits integrin-mediated platelet adhesion and spreading on collagen. *J Thromb Haemost*, 6, 2175-2185.
- Robicsek, F., Lawhorn, R., Robicsek, S., & Norton, H. J. (1992). Comparison of knitted and woven aortoiliac and aortofemoral Dacron prostheses in the same patient: a 10-year prospective study. *J Long.Term.Eff.Med Implants.*, 2, 127-136.
- Robotin-Johnson, M. C., Swanson, P. E., Johnson, D. C., Schuessler, R. B., & Cox, J. L. (1998). An experimental model of small intestinal submucosa as a growing vascular graft. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 116, 805-811.

- Rocco, M. V., Bleyer, A. J., & Burkart, J. M. (1996). Utilization of inpatient and outpatient resources for the management of hemodialysis access complications. *Am.J Kidney.Dis.*, 28, 250-256.
- Rogerson, M. E., Cairns, H. S., Fairbanks, L. D., Westwick, J., & Neild, G. H. (1993). Endothelin-1 in the rabbit: interactions with cyclo-oxygenase and NO-synthase products. *Br.J Pharmacol.*, 108, 838-843.
- Rosenberg, N., Martinez, A., Sawyer, P. N., Wesolowski, S. A., Postlethwait, R. W., & Dillon, M. L., Jr. (1966). Tanned collagen arterial prosthesis of bovine carotid origin in man. Preliminary studies of enzyme-treated heterografts. *Ann.Surg.*, 164, 247-256.
- Ross, B., McKendy, K., & Giaid, A. (2010). Role of urotensin II in health and disease. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298, R1156-R1172.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, 138, S419-S420.
- Rothwell, P. M., Villagra, R., Gibson, R., Donders, R. C., & Warlow, C. P. (2000). Evidence of a chronic systemic cause of instability of atherosclerotic plaques. *The Lancet*, 355, 19-24.
- Rotmans, J. I., Heyligers, J. M. M., Verhagen, H. J. M., Velema, E., Nagtegaal, M. M., de Kleijn, D. P. V. et al. (2005). In Vivo Cell Seeding With Anti-CD34 Antibodies Successfully Accelerates Endothelialization but Stimulates Intimal Hyperplasia in Porcine Arteriovenous Expanded Polytetrafluoroethylene Grafts. *Circulation*, 112, 12-18.
- Rowe, S. L., Lee, S., & Stegemann, J. P. (2007). Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. *Acta Biomater.*, 3, 59-67.
- Rowe, S. L. & Stegemann, J. P. (2006). Interpenetrating collagen-fibrin composite matrices with varying protein contents and ratios. *Biomacromolecules.*, 7, 2942-2948.
- Rubanyi, G. M., Freay, A. D., Kauser, K., Johns, A., & Harder, D. R. (1990). Mechanoreception by the endothelium: mediators and mechanisms of pressure- and flow-induced vascular responses. *Blood.Vessels.*, 27, 246-257.

- Rubens, F. D., Weitz, J. I., Brash, J. L., & Kinlough-Rathbone, R. L. (1993). The effect of antithrombin III-independent thrombin inhibitors and heparin on fibrin accretion onto fibrin-coated polyethylene. *Thrombosis and haemostasis*, 69, 130-134.
- Saba, D., Yilmaz, M., Yavuz, H., Noyan, S., Avci, B., Ercan, A. et al. (2007). Sutureless Vascular Anastomoses by N-Butyl-2 Cyanoacrylate Adhesive: An Experimental Animal Study. *European Surgical Research*, 39, 239-244.
- Sabik, J. F., III, Lytle, B. W., Blackstone, E. H., Houghtaling, P. L., & Cosgrove, D. M. (2005). Comparison of saphenous vein and internal thoracic artery graft patency by coronary system. *Ann.Thorac.Surg.*, 79, 544-551.
- Salacinski, H. J., Tai, N. R., Carson, R. J., Edwards, A., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2002). In vitro stability of a novel compliant poly(carbonate-urea)urethane to oxidative and hydrolytic stress. *J Biomed Mater.Res.*, 59, 207-218.
- Salo, J. A., Soisalon-Soininen, S., Bondestam, S., & Mattila, P. S. (1999). Familial occurrence of abdominal aortic aneurysm. *Ann.Intern.Med.*, 130, 637-642.
- Sandusky, G. E., Jr., Badylak, S. F., Morff, R. J., Johnson, W. D., & Lantz, G. (1992). Histologic findings after in vivo placement of small intestine submucosal vascular grafts and saphenous vein grafts in the carotid artery in dogs. *Am.J Pathol*, 140, 317-324.
- Sandusky, G. E., Lantz, G. C., & Badylak, S. F. (1995). Healing comparison of small intestine submucosa and ePTFE grafts in the canine carotid artery. *J Surg Res.*, 58, 415-420.
- Santerre, J. P. & Labow, R. S. (1997). The effect of hard segment size on the hydrolytic stability of polyether-urea-urethanes when exposed to cholesterol esterase. *J Biomed Mater.Res.*, 36, 223-232.
- Sardelic, F., Fletcher, J. P., Ao, P. Y., & Bilous, M. (1994). Comparison of fluoropolymer passivated Dacron and polytetrafluoroethylene grafts in a sheep model. *Cardiovasc Surg*, 2, 237-241.
- Sarkar, S., Burriesci, G., Wojcik, A., Aresti, N., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2009). Manufacture of small calibre quadruple lamina vascular bypass grafts using a novel automated extrusion-phase-inversion method and nanocomposite polymer. *J Biomech.*, 42, 722-730.

- Sarkar, S., Salacinski, H. J., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2006). The mechanical properties of infrainguinal vascular bypass grafts: their role in influencing patency. *Eur.J Vasc Endovasc.Surg*, 31, 627-636.
- Sawada, K., Shimoyama, T., Malchesky, P. S., Goldcamp, J. B., & Omokawa, S. (1993). Evaluation of a relationship between polymer bulk hydroxyl and surface oxygen content and in vitro serumGÇômaterial interaction. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27, 547-555.
- Sbarbati, R., Giannessi, D., Cenni, M. C., Lazzerini, G., Verni, F., & De, C. R. (1991). Pyrolytic carbon coating enhances Teflon and Dacron fabric compatibility with endothelial cell growth. *Int.J Artif.Organs*, 14, 491-498.
- Scharn, D. M., Dirven, M., Barendregt, W. B., Boll, A. P. M., Roelofs, D., & van der Vliet, J. A. (2008). Human Umbilical Vein versus Heparin-bonded Polyester for Femoro-popliteal Bypass: 5-year Results of a Prospective Randomized Multicentre Trial. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 35, 61-67.
- Schirmang, T. C., Ahn, S. H., Murphy, T. P., Dubel, G. J., & Soares, G. M. (2009). Peripheral arterial disease: update of overview and treatment. *Med.Health R.I.*, 92, 398-402.
- Schoen, F. J. & Padera, J. (2013). B - Endovascular Stents, Vascular Grafts, and Stent Grafts. In B.D.Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, & J. E. Lemons (Eds.), *Biomaterials Science (Third Edition)* (pp. 771-784). Academic Press.
- Scholl, F. G., Boucek, M. M., Chan, K. C., Valdes-Cruz, L., & Perryman, R. (2010). Preliminary experience with cardiac reconstruction using decellularized porcine extracellular matrix scaffold: human applications in congenital heart disease. *World J Pediatr.Congenit.Heart Surg*, 1, 132-136.
- Schutte, S. C. & Nerem, R. M. (2013). Chapter II.6.9 - Blood Vessel Tissue Engineering. In B.D.Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, & J. E. Lemons (Eds.), *Biomaterials Science (Third Edition)* (pp. 1237-1246). Academic Press.
- Sciarretta, F. V. (2013). 5 to 8 years follow-up of knee chondral defects treated by PVA-H hydrogel implants. *Eur.Rev.Med.Pharmacol.Sci.*, 17, 3031-3038.
- Scott, S. M., Gaddy, L. R., Sahmel, R., & Hoffman, H. (1987). A collagen coated vascular prosthesis. *J Cardiovasc Surg (Torino.)*, 28, 498-504.

- Seifalian, A. M., Salacinski, H. J., Tiwari, A., Edwards, A., Bowald, S., & Hamilton, G. (2003). In vivo biostability of a poly(carbonate-urea)urethane graft. *Biomaterials.*, 24, 2549-2557.
- Selvin, E. & Erlinger, T. P. (2004). Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation*, 110, 738-743.
- Seo, K. H., You, S. J., Chun, H. J., Who, C. H. K., & Lim, Y. (2009). In Vitro and In Vivo Biocompatibility of γ -ray Crosslinked Gelatin-Poly(vinyl Alcohol) Hydrogels. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6, 414-418.
- Shadwick, R. E. (1999). Mechanical design in arteries. *J Exp.Biol*, 202, 3305-3313.
- Sharma, J. N. (2013). The kinin system in hypertensive pathophysiology. *Inflammopharmacology.*, 21, 1-9.
- Shen, M., Martinson, L., Wagner, M. S., Castner, D. G., Ratner, B. D., & Horbett, T. A. (2002). PEO-like plasma polymerized tetraglyme surface interactions with leukocytes and proteins: in vitro and in vivo studies. *J Biomater.Sci.Polym.Ed*, 13, 367-390.
- Sheppard, J. I., McClung, W. G., & Feuerstein, I. A. (1994). Adherent platelet morphology on adsorbed fibrinogen: Effects of protein incubation time and albumin addition. *Journal of Biomedical Materials Research*, 28, 1175-1186.
- Shigematsu, K., Yasuhara, H., Shigematsu, H., & Muto, T. (2000). Direct and indirect effects of pulsatile shear stress on the smooth muscle cell. *Int.Angiol.*, 19, 39-46.
- Shin'oka, T., Imai, Y., & Ikada, Y. (2001). Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *New England Journal of Medicine*, 344, 532-533.
- Shindo, M. L., Costantino, P. D., Nalbone, V. P., Rice, D. H., & Sinha, U. K. (1996). Use of a mechanical microvascular anastomotic device in head and neck free tissue transfer. *Arch.Otolaryngol.Head Neck.Surg.*, 122, 529-532.
- Shinoka, T. & Breuer, C. (2008). Tissue-engineered blood vessels in pediatric cardiac surgery. *Yale J Biol.Med*, 81, 161-166.
- Shinoka, T., Shum-Tim, D., Ma, P. X., Tanel, R. E., Isogai, N., Langer, R. et al. (1998). Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 115, 536-545.

- Shojaei, S., Tafazzoli-Shahdpour, M., Shokrgozar, M. A., & Haghighipour, N. (2013). Effects of mechanical and chemical stimuli on differentiation of human adipose-derived stem cells into endothelial cells. *Int.J Artif.Organs*, 36, 663-673.
- Shum-Tim, D., Stock, U., Hrkach, J., Shinoka, T., Lien, J., Moses, M. A. et al. (1999). Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *Ann.Thorac Surg*, 68, 2298-2304.
- Silverberg, E., Boring, C. C., & Squires, T. S. (1990). Cancer statistics, 1990. *CA.Cancer J.Clin.*, 40, 9-26.
- Singh, K., Bonna, K. H., Jacobsen, B. K., Bjork, L., & Solberg, S. (2001). Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study : The Tromso Study. *Am.J.Epidemiol.*, 154, 236-244.
- Sinn, S., Scheuermann, T., Deichelbohrer, S., Ziemer, G., & Wendel, H. P. (2011). A novel in vitro model for preclinical testing of the hemocompatibility of intravascular stents according to ISO 10993-4. *J Mater Sci.Mater Med.*, 22, 1521-1528.
- Sivaraman, B. & Latour, R. A. (2010). The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount of adsorbed fibrinogen. *Biomaterials*, 31, 832-839.
- Smart, A., Martin, P., & Parker, M. (2004). Tailored medicine: whom will it fit? The ethics of patient and disease stratification. *Bioethics.*, 18, 322-342.
- Sobieszczyk, P. & Beckman, J. (2006). Carotid Artery Disease. *Circulation*, 114, e244-e247.
- Soldani, G., Losi, P., Bernabei, M., Burchielli, S., Chiappino, D., Kull, S. et al. (2010). Long term performance of small-diameter vascular grafts made of poly(ether)urethane-polydimethylsiloxane semi-interpenetrating polymeric network. *Biomaterials*, 31, 2592-2605.
- Sommeling, C. A., Buth, J., & Jakimowicz, J. J. (1990). Long-term behaviour of modified human umbilical vein grafts; late aneurysmal degeneration established by colour-duplex scanning. *Eur.J Vasc.Surg*, 4, 89-94.
- Sottiurai, V. S. (1999). Distal Anastomotic Intimal Hyperplasia: Histocytomorphology, Pathophysiology, Etiology, and Prevention. *Int.J Angiol.*, 8, 1-10.

- Spark, J. I., Yeluri, S., Derham, C., Wong, Y. T., & Leitch, D. (2008). Incomplete cellular depopulation may explain the high failure rate of bovine ureteric grafts. *Br.J Surg.*, 95, 582-585.
- Spotnitz, W. D. (2001). Commercial fibrin sealants in surgical care. *Am.J.Surg.*, 182, 8S-14S.
- Stammen, J. A., Williams, S., Ku, D. N., & Guldberg, R. E. (2001). Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. *Biomaterials.*, 22, 799-806.
- Steinberg, D. (1997). Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*, 95, 1062-1071.
- Stewart, D. J., Levy, R. D., Cernacek, P., & Langleben, D. (1991). Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann.Intern.Med*, 114, 464-469.
- Stopeck, A. T., Nicholson, A. C., Mancini, F. P., & Hajjar, D. P. (1993). Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem.*, 268, 17489-17494.
- Strahm, Y., Flueckiger, A., Billinger, M., Meier, P., Mettler, D., Weisser, S. et al. (2010). Endothelial-cell-binding aptamer for coating of intracoronary stents. *J Invasive.Cardiol.*, 22, 481-487.
- Strobel, R., Boontje, A. H., & Van Den Dungen, J. J. A. M. (1996). Aneurysm formation in modified human umbilical vein grafts. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 11, 417-420.
- Sun, J., Sui, X., Bradbury, J. A., Zeldin, D. C., Conte, M. S., & Liao, J. K. (2002). Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Migration by Cytochrome P450 Epoxygenase-Derived Eicosanoids. *Circulation Research*, 90, 1020-1027.
- Sunamura, M., Ishibashi, H., & Karino, T. (2007). Flow patterns and preferred sites of intimal thickening in diameter-mismatched vein graft interpositions. *Surgery*, 141, 764-776.
- Sung, H. W., Hsu, C. S., Chen, H. C., Hsu, H. L., Chang, Y., Lu, J. H. et al. (1997). Fixation of various porcine arteries with an epoxy compound. *Artif.Organs*, 21, 50-58.

- Supaporn, T., Wennberg, P. W., Wei, C. M., Kinoshita, M., Matsuda, Y., & Burnett, J. C. (1996). Role for the endogenous natriuretic peptide system in the control of basal coronary vascular tone in dogs. *Clin.Sci.(Lond)*, 90, 357-362.
- Tamada, Y., Kulik, E. A., & Ikada, Y. (1995). Simple method for platelet counting. *Biomaterials*, 16, 259-261.
- Tang, S. C., Leung, J. C., & Lai, K. N. (2011). The kallikrein-kinin system. *Contrib.Nephrol.*, 170, 145-155.
- Tanzi, M. C., Fare, S., & Petrini, P. (2000). In vitro stability of polyether and polycarbonate urethanes. *J Biomater.Appl.*, 14, 325-348.
- Taylor, A., Fletcher, J. P., & Ao, P. Y. (1996). Inhibition of fibro-intimal hyperplasia in a polytetrafluoroethylene vascular graft with standard heparin and low molecular weight heparin. *Aust.N.Z.J Surg*, 66, 764-767.
- Taylor, L. M., Jr., Edwards, J. M., & Porter, J. M. (1990). Present status of reversed vein bypass grafting: five-year results of a modern series. *J Vasc.Surg*, 11, 193-205.
- Teebken, O. E. & Haverich, A. (2002). Tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg.*, 23, 475-485.
- Teufelsbauer, H., Prusa, A. M., Wolff, K., Polterauer, P., Nanobashvili, J., Prager, M. et al. (2002). Endovascular stent grafting versus open surgical operation in patients with infrarenal aortic aneurysms: a propensity score-adjusted analysis. *Circulation*, 106, 782-787.
- Thomas, J., Gomes, K., Lowman, A., & Marcolongo, M. (2004). The effect of dehydration history on PVA/PVP hydrogels for nucleus pulposus replacement. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 69B, 135-140.
- Thum, T., Fleissner, F., Klink, I., Tsikas, D., Jakob, M., Bauersachs, J. et al. (2007). Growth hormone treatment improves markers of systemic nitric oxide bioavailability via insulin-like growth factor-I. *J Clin.Endocrinol.Metab*, 92, 4172-4179.
- Thum, T., Tsikas, D., Stein, S., Schultheiss, M., Eigenthaler, M., Anker, S. D. et al. (2005). Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll.Cardiol.*, 46, 1693-1701.

- Tillman, P., Carson, S. N., & Talken, L. (1981). Platelet function and coagulation parameters in sheep during experimental vascular surgery. *Lab.Anim Sci.*, 31, 263-267.
- Titushkin, I. A., Vasin, S. L., Rozanova, I. B., Pokidysheva, E. N., Alekhin, A. P., & Sevastianov, V. I. (2001). Carbon coated polyethylene: effect of surface energetics and topography on human platelet adhesion. *ASAIO J*, 47, 11-17.
- Tolva, V., Bertoni, G. B., Trimarchi, S., Grassi, V., Fusari, M., & Rampoldi, V. (2007). Unreliability of depopulated bovine ureteric xenograft for infra inguinal bypass surgery: mid-term results from two vascular centres. *Eur.J Vasc.Endovasc.Surg.*, 33, 214-216.
- Tranquillo, R. T. (2002). The tissue-engineered small-diameter artery. *Ann.N Y.Acad.Sci.*, 961, 251-254.
- Trubel, W., Schima, H., Moritz, A., Raderer, F., Windisch, A., Ullrich, R. et al. (1995). Compliance mismatch and formation of distal anastomotic intimal hyperplasia in externally stiffened and lumen-adapted venous grafts. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, 10, 415-423.
- Tsuchida, H., Cameron, B. L., Marcus, C. S., & Wilson, S. E. (1992). Modified polytetrafluoroethylene: indium 111-labeled platelet deposition on carbon-lined and high-porosity polytetrafluoroethylene grafts. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 16, 643-649.
- Twine, C. P. & McLain, A. D. (2010). Graft type for femoro-popliteal bypass surgery. *Cochrane.Database.Syst.Rev.*, CD001487.
- Unnithan, A. R., Barakat, N. A. M., Tirupathi Pichiah, P. B., Gnanasekaran, G., Nirmala, R., Cha, Y. S. et al. (2012). Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun polyurethaneGÇôdextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1786-1793.
- van der Kamp, K. W., Hauch, K. D., Feijen, J., & Horbett, T. A. (1995). Contact activation during incubation of five different polyurethanes or glass in plasma. *J Biomed Mater Res*, 29, 1303-1306.

- van Det, R. J., Vriens, B. H., van der Palen, J., & Geelkerken, R. H. (2009). Dacron or ePTFE for femoro-popliteal above-knee bypass grafting: short- and long-term results of a multicentre randomised trial. *Eur.J Vasc.Endovasc.Surg*, 37, 457-463.
- van Lith R & Ameer, G. (2011). Biohybrid strategies for vascular grafts . In Pallua N & Suscheck CV (Eds.), *Tissue Engineering* (pp. 279-314). Heidelberg: Springer Berlin.
- Villalona, G. A., Udelsman, B., Duncan, D. R., McGillicuddy, E., Sawh-Martinez, R. F., Hibino, N. et al. (2010). Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tissue.Eng.Part.B.Rev.*, 16, 341-350.
- Wagenseil, J. E. & Mecham, R. P. (2009). Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev*, 89, 957-989.
- Wake, M. C., Gupta, P. K., & Mikos, A. G. (1996). Fabrication of pliable biodegradable polymer foams to engineer soft tissues. *Cell Transplant.*, 5, 465-473.
- Walpoth, B. H. & Bowlin, G. L. (2005). The daunting quest for a small diameter vascular graft. *Expert.Rev.Med.Devices*, 2, 647-651.
- Wan, W. K., Campbell, G., Zhang, Z. F., Hui, A. J., & Boughner, D. R. (2002). Optimizing the tensile properties of polyvinyl alcohol hydrogel for the construction of a bioprosthetic heart valve stent. *Journal of Biomedical Materials Research*, 63, 854-861.
- Wang, L. C., Guo, G. X., Tu, R., & Hwang, N. H. (1990). Graft compliance and anastomotic flow patterns. *ASAIO Trans.*, 36, 90-94.
- Wang, M., Li, Y., Wu, J., Xu, F., Zuo, Y., & Jansen, J. A. (2008). In vitro and in vivo study to the biocompatibility and biodegradation of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol)/gelatin composite. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85A, 418-426.
- Wang, P. G., Xian, M., Tang, X., Wu, X., Wen, Z., Cai, T. et al. (2002). Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem.Rev*, 102, 1091-1134.
- Wang, S., Gupta, A. S., Sagnella, S., Barendt, P. M., Kottke-Marchant, K., & Marchant, R. E. (2009). Biomimetic Fluorocarbon Surfactant Polymers Reduce Platelet Adhesion on PTFE/ePTFE Surfaces. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 20[5-6], 619-635.

- Wang, T., Nie, J., & Yang, D. (2012). Dextran and gelatin based photocrosslinkable tissue adhesive. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1428-1436.
- Watanabe, M., Shin'oka, T., Tohyama, S., Hibino, N., Konuma, T., Matsumura, G. et al. (2001). Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. *Tissue.Eng.*, 7, 429-439.
- Watase, M., Kambayashi, J., Itoh, T., Tsuji, Y., Kawasaki, T., Shiba, E. et al. (1992). Ultrastructural analysis of pseudo-intimal hyperplasia of polytetrafluoroethylene prostheses implanted into the venous and arterial systems. *Eur J Vasc Surg*, 6, 371-380.
- Wei, J., Chang, C. Y., Chuang, Y. C., Sue, S. H., Lee, K. C., & Tung, D. (2009). A new vascular ring connector in surgery for aortic dissection. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*, 138, 674-677.
- Weinberg, C. B. & Bell, E. (1986). A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science.*, 231, 397-400.
- Weiss, D. J. & Wardrop, K. J. (2011). *Schalm's Veterinary Hematology*. Wiley.
- Weiss, M. L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K. B., Weiss, R. J., VanderWerff, I. et al. (2008). Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*, 26, 2865-2874.
- Wellington, J. L. (1981). Umbilical vein grafts for vascular access in patients on long-term dialysis. *Can.J Surg*, 24, 608-609.
- Weston, M. W., Rhee, K., & Tarbell, J. M. (1996). Compliance and diameter mismatch affect the wall shear rate distribution near an end-to-end anastomosis. *J Biomech.*, 29, 187-198.
- Wilhelmi, M. H., Tiede, A., Teebken, O. E., Bisdas, T., Haverich, A., & Mischke, R. (2012). Ovine Blood: Establishment of a List of Reference Values Relevant for Blood Coagulation in Sheep. *ASAIO Journal*, 58.
- Wilson, S. E., Krug, R., Mueller, G., & Wilson, L. (1997). Late disruption of Dacron aortic grafts. *Ann.Vasc.Surg*, 11, 383-386.
- Winkelmann, B. R. (2004). American Heart Association scientific sessions. *Expert Opin.Investig.Drugs*, 13, 435-445.

- Witzenbichler, B., Asahara, T., Murohara, T., Silver, M., Spyridopoulos, I., Magner, M. et al. (1998). Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *The American journal of pathology*, 153, 381-394.
- Wolf-de Jonge, I. C., Beek, J. F., & Balm, R. (2004). 25 years of laser assisted vascular anastomosis (LAVA): what have we learned? *Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg.*, 27, 466-476.
- Wolf-de Jonge, I. C., Heger, M., van, M. J., Balm, R., & Beek, J. F. (2008). Suture-free laser-assisted vessel repair using CO2 laser and liquid albumin solder. *J.Biomed Opt.*, 13, 044032.
- Wong, B. J., Wilkins, B. W., & Minson, C. T. (2004). H1 but not H2 histamine receptor activation contributes to the rise in skin blood flow during whole body heating in humans. *The Journal of Physiology*, 560, 941-948.
- World Health Organization (2012). Cardiovascular disease: Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*.
- Wystrychowski, W., McAllister, T. N., Zagalski, K., Dusserre, N., Cierpka, L., & L'Heureux, N. (7-10-2013). First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*.
- Xie, S., Nie, R., & Wang, J. (2009). Inhibiting extracellular matrix metalloproteinase inducer maybe beneficial for diminishing the atherosclerotic plaque instability. *J Postgrad.Med.*, 55, 284-286.
- Xu, M., Qiu, J., Lin, Y., Shi, X., Chen, H., & Xiao, T. (2010). Surface biocompatible modification of polypropylene by entrapment of polypropylene-block-poly(vinylpyrrolidone). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80, 200-205.
- Xue, L. & Greisler, H. P. (2003). Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *J Vasc.Surg*, 37, 472-480.
- Yadav, J. S., Wholey, M. H., Kuntz, R. E., Fayad, P., Katzen, B. T., Mishkel, G. J. et al. (2004). Protected carotid-artery stenting versus endarterectomy in high-risk patients. *N.Engl.J Med.*, 351, 1493-1501.

- Yanagisawa, A. & Lefer, A. M. (1988). Pharmacological actions of synthetic atrial natriuretic factor on coronary vascular smooth muscle. *Jpn.Circ.J*, 52, 1436-1440.
- Yanagisawa, A., Osborne, J. A., Stahl, G. L., & Lefer, A. M. (1987). Coronary vascular actions of synthetic atrial natriuretic factor in isolated vascular preparations. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 10, 320-326.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y. et al. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332, 411-415.
- Yang, C. C., Shih, Y. H., Ko, M. H., Hsu, S. Y., Cheng, H., & Fu, Y. S. (2008). Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS.One.*, 3, e3336.
- Yaseen, M., Zhao, X., Freund, A., Seifalian, A. M., & Lu, J. R. (2010). Surface structural conformations of fibrinogen polypeptides for improved biocompatibility. *Biomaterials*, 31, 3781-3792.
- Yoshimoto, T., Matsushita, M., & Hirata, Y. (2004). Role of urotensin II in peripheral tissue as an autocrine/paracrine growth factor. *Peptides*, 25, 1775-1781.
- Zeerleder, S., Mauron, T., Lämmle, B., & Wuillemin, W. A. (2002). Effect of low-molecular weight dextran sulfate on coagulation and platelet function tests. *Thrombosis Research*, 105, 441-446.
- Zeng, L., Xiao, Q., Margariti, A., Zhang, Z., Zampetaki, A., Patel, S. et al. (2006). HDAC3 is crucial in shear- and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 174, 1059-1069.
- Zhang, J., Qi, H., Wang, H., Hu, P., Ou, L., Guo, S. et al. (2006). Engineering of vascular grafts with genetically modified bone marrow mesenchymal stem cells on poly (propylene carbonate) graft. *Artif.Organs*, 30, 898-905.
- Zhang, Z., Marois, Y., Guidoin, R. G., Bull, P., Marois, M., How, T. et al. (1997). Vascugraft polyurethane arterial prosthesis as femoro-popliteal and femoro-peroneal bypasses in humans: pathological, structural and chemical analyses of four excised grafts. *Biomaterials.*, 18, 113-124.

- Xia, Z., & Triffitt, J. (2006). A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomedical Materials*, 1, R1.
- Zhong T, Vaughan C, & Bowen A (2003). Microvascular Surgical Techniques. In Malizos KN (Ed.), *Reconstructive Microsurgery* (1st ed., pp. 1-7). GeorgeTown: Landes Bioscience.
- Zhuo, R., Miller, R., Bussard, K. M., Siedlecki, C. A., & Vogler, E. A. (2005). Procoagulant stimulus processing by the intrinsic pathway of blood plasma coagulation. *Biomaterials*, 26, 2965-2973.
- Zhuo, R., Siedlecki, C. A., & Vogler, E. A. (2006). Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Biomaterials*, 27, 4325-4332.
- Ziats, N. P., Pankowsky, D. A., Tierney, B. P., Ratnoff, O. D., & Anderson, J. M. (1990). Adsorption of Hageman factor (factor XII) and other human plasma proteins to biomedical polymers. *J Lab Clin.Med.*, 116, 687-696.
- Zilla, P., Bezuidenhout, D., & Human, P. (2007). Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials*, 28, 5009-5027.
- Zoccali, C. & Mallamaci, F. (2008). Urotensin II: a cardiovascular and renal update. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.*, 17, 199-204.